REGULATION DER CITRAT-LYASE IN ENTEROBACTER AEROGENES UND ESCHERICHIA COLI

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Hans Kulla
aus Egling/Bayern

Göttingen 1976

REGULATION DER CITRAT-LYASE IN ENTEROBACTER AEROGENES UND ESCHERICHIA COLI

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Hans Kulla
aus Egling/Bayern

Göttingen 1976

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie
der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk
Korreferent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 5. November 1976

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
δ-Als	δ-Aminolaevulinsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphat-Phosphohydrolase
c-AMP	cyclo-Adenosin-3',5'-monophosphat
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CL	Citrat-Lyase
CoA	Coenzym A
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DNP	Dinitrophenol
E	internationale Enzymeinheit
E. aerogenes	Enterobacter aerogenes
E. coli	Escherichia coli
Ex.	Extinktion
HQNO	2-Heptyl-4-Hydroxychinolin-N-Oxyd
KP	Kaliumphosphat
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
NEM	N-Äthylmaleinimid
O.D.	"Optische Dichte"; Extinktion (Trübung) einer Bakterienkultur
P	Phosphat
PCMB	p-Chlormercuribenzoat
PCP	Pentachlorphenol
R. gelatinosa	Rhodopseudomonas gelatinosa
TCS	Tetrachlorsalicylanilid
THF	Tetrahydrofolsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Umdrehungen
μ	Wachstumsrate

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	4
2.1. Versuche mit Enterobacter aerogenes	4
2.1.1. Stoffwechselweg der Citrat-Vergärung bei Enterobacter aerogenes	4
2.1.2. Umschaltexperimente in der kontinuierlichen Kultur	9
2.1.2.1. Übergang von anaerobem auf aerobes Citrat-Wachstum	11
2.1.2.2. Übergang von anaerobem Citrat- auf aerobes Glucose-Wachstum	13
2.1.2.3. In vivo-Reaktivierung der Citrat-Lyase	15
2.1.2.4. Glutamat-Zusatz im in vivo-Inaktivierungsexperiment	17
2.1.2.5. Übergang von anaerobem Citrat- auf anaerobes Glucose-Wachstum	20
2.1.2.6. Ist bei anaerobem Glucose-Wachstum das aktivierende Enzym angeschaltet?	25
2.1.2.7. Übergang von anaerobem Citrat-Wachstum auf anaerobes Wachstum mit Citrat plus Glucose	26
2.1.2.8. Ist bei anaerobem Wachstum auf Citrat plus Glucose das aktivierende Enzym angeschaltet?	28
2.1.2.9. Citrat-Produktion und Reaktionsinaktivierung	29
2.1.2.10. Zusammenfassung und Neuorientierung	31
2.1.2.11. Übergang von anaerobem Citrat- auf anaerobes Glucose-Wachstum mit Nitrat	32
2.1.2.12. Anaerobes Wachstum auf Citrat plus Nitrat	35
2.1.2.13. Umschalten von anaerobem Citrat- auf aerobes Citrat-Wachstum unter Sulfat-Mangel-Bedingungen	39
2.1.3. Einfluß der C- und Energiequelle auf die Citrat-Lyase-Inaktivierungsaktivität	41
2.1.4. Versuche mit Protein-, RNS- und DNS-Synthesehemmern	42

Seite

2.1.5. Citrat-Lyase-Inaktivierung unter dem Einfluß von Entkopplern und Hemmern der Atmungskette 44

2.1.6. In vitro-Inaktivierung der Citrat-Lyase aus Enterobacter aerogenes 52

2.1.6.1. Extraktion von shift-Phasen-Zellen 58

2.1.7. Lokalisation der Citrat-Lyase 60

2.2. Regulation der Citrat-Lyase in Escherichia coli 61

2.2.1. Wirkung von Hemmern und Entkopplern des Elektronentransportes auf die aerobe und anaerobe Citrat-Lyase-Inaktivierung von E. coli 67

2.2.2. Inaktivierung der Citrat-Lyase in elektronentransport- und energiekopplungsgeschädigten Mutanten von E. coli K 12 68

3. DISKUSSION 76

4. ZUSAMMENFASSUNG 89

5. MATERIAL UND METHODEN 91

6. LITERATURVERZEICHNIS 108

1. EINLEITUNG

Citrat-Lyase katalysiert die Spaltung des Citrats zu Oxalacetat und Acetat. Dies ist bei vielen Bakterien der erste Schritt in der Reaktionskette des katabolischen Citrat-Abbaus unter anaeroben Bedingungen (DEFFNER und FRANKE, 1939; BREWER und WERKMAN, 1939; CAMPBELL und GUNSALUS, 1944; SCHAAB et al., 1972; WALTHER et al., 1976).

Citrat-Lyase aus Enterobacter aerogenes ist ein außerordentlich gut untersuchtes Enzym. Interesse erweckt es durch die Tatsache, daß es in einer aktiven und einer inaktiven Form auftreten kann; beide Formen sind ineinander überführbar (BUCKEL et al., 1971). Die Autoren konnten zeigen, daß im Unterschied zur inaktiven Citrat-Lyase das aktive Enzym kovalent gebundene Acetylgruppen trägt. Als Reaktionsmechanismus postulierten sie einen Acylaustausch, gefolgt von der eigentlichen Lyasereaktion:

(A) E - S - Acetyl + Citrat $\rightleftharpoons$ E - S - Citryl + Acetat

(B) E - S - Citryl $\rightleftharpoons$ E - S - Acetyl + Oxalacetat

---

(C) Citrat $\rightleftharpoons$ Acetat + Oxalacetat

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite der Spaltung (TATE und DATTA, 1965; GUYNN et al., 1973).

Das Enzym zeigt eine weitere erstaunliche Eigenschaft: Es inaktiviert sich durch Citrat-Umsatz. SINGH und SRERE (1971) bezeichneten dies treffend als "suicide" oder Reaktionsinaktivierung. BUCKEL et al. (1971) deuteten den Vorgang als Seitenreaktion des Intermediats:

(D) E - S - Citryl + H_2O $\longrightarrow$ E - S - H + Citrat

Eine Inaktivierung der Citrat-Lyase wird auch durch Inkubation mit Oxal-

acetat erreicht. Dieser Vorgang erklärt sich von selbst durch Kombination der Gleichungen (B) und (D).

Besonders die Arbeitsgruppen um EGGERER und SRERE konnten bei der Untersuchung der Citrat-Lyase aus E. aerogenes zum Teil bis auf die molekulare Basis von Struktur und Mechanismus vorstoßen. Das Molekulargewicht des Enzyms liegt bei 550 000 Dalton (BOWEN und MORTIMER, 1971; MAHADIK und SIVA RAMAN, 1968; CARPENTER et al., 1975; SINGH et al., 1976). Das Enzym enthält drei nichtidentische Untereinheiten mit den Molekulargewichten 54 000, 32 000 und 10 000 Dalton (CARPENTER et al., 1975; DIMROTH und EGGERER, 1975). Jede Untereinheit ist in einem Citrat-Lyase-Molekül sechsfach vorhanden. Wie elektronenmikroskopische Bilder zeigen, sind diese sandwichartig angeordnet (BEUSCHER et al., 1974; KÜMMEL, 1976). DIMROTH et al. (1973, 1975) konnten den Untereinheiten verschiedene Funktionen im Citrat-Lyase-Komplex zuordnen. Die kleine Untereinheit ähnelt in Aufgabe und Struktur stark dem Acyl-carrier Protein der Fettsäuresynthetase, ist mit dieser jedoch nicht austauschbar (DIMROTH et al., 1973). Das Acyl-carrier Protein enthält in der prosthetischen Gruppe Pantethein (SRERE et al., 1972; ROBINSON et al., 1976; DIMROTH, 1976). An dessen SH-Gruppe ist das Acetyl bzw. Citryl gebunden. Die Aufgabe des Acyl-carrier- Proteins ist es nun, diese Liganden den beiden großen Untereinheiten zuzuführen. Die größere der beiden katalysiert den Acylaustausch, die kleinere die Lyase-Reaktion (DIMROTH und EGGERER, 1975). In Multienzymkomplexen ist diese Art der Aufgabenteilung oft zu beobachten (GINSBURG und STADTMAN, 1970). In dieser Beziehung ähnelt vor allem der Transcarboxylase-Komplex stark der Citrat-Lyase. Er ist ebenfalls aus zwei verschiedenen Enzymen aufgebaut und enthält einen Biotin-haltigen carrier (WOOD et al., 1975).

In ihrem Aufbau scheinen sich die Citrat-Lyasen aus verschiedenen Organismen zu gleichen (Rhodopseudomonas gelatinosa: BEUSCHER et al., 1974; Streptococcus diacetilactis: KÜMMEL, 1976; E. aerogenes: DIMROTH und

EGGERER, 1975; SINGH et al., 1976). Auch die Citramalat-Lyase aus Clostridium tetanomorphum zeigt eine verblüffende strukturelle Verwandtschaft mit der Citrat-Lyase (BUCKEL und BOBI, 1976). Soweit wir bisher Einblick haben, scheint jedoch die Regulation für jedes der Enzyme anders gelöst zu sein.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation der Citrat-Lyase in E. aerogenes zu untersuchen. Später erwies es sich als notwendig, auch E. coli mit einzubeziehen.

Da die Citrat-Lyase ein Antagonist der Citrat-Synthase ist, war von vorneherein zu vermuten, daß das Enzym einer strikten Regulation unterworfen ist. An zentraler Stoffwechselstelle erfüllt die Citrat-Synthase zwei Funktionen: Sie katalysiert die Startreaktion des Citronensäurecyclus und sie eröffnet den Biosyntheseweg zum Glutamat. Paralleles Vorliegen von Citrat-Lyase- und Citrat-Synthase-Aktivität muß vermieden werden, da das zum Aufbau eines "futile cycle" (HERS et al., 1970) führen würde: Das von der Citrat-Synthase energieaufwendig synthetisierte Citrat würde durch die aktive Citrat-Lyase wieder zersetzt werden. Die Folgen wären Energieverlust und eine Störung des Citronensäurecyclus oder der Glutamat-Biosynthese.

Es war zu vermuten, daß die Citrat-Lyase in E. aerogenes nach dem Vorbild von Rhodopseudomonas gelatinosa (GIFFHORN, 1974) einer Regulation durch kovalente Modifikation (Acetylierung und Desacetylierung) unterliegt. In Analogie zu anderen bekannten Systemen (HOLZER und DUNTZE, 1971; SEGAL, 1973) müßten ein aktivierendes (acetylierendes) und ein inaktivierendes (desacetylierendes) Enzym vorliegen, die die Citrat-Lyase nach Bedarf an- oder abstellen. Eine andere Möglichkeit wäre, daß als Antagonist des aktivierenden Enzyms die Reaktionsinaktivierung eine Rolle spielt.

2. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

2.1. Versuche mit Enterobacter aerogenes

Der größte Teil der Untersuchungen zur Regulation der Citrat-Lyase in E. aerogenes wurde in kontinuierlicher Kultur durchgeführt. Diese Methode wurde gewählt, da vorausgehende Untersuchungen gezeigt hatten, daß die Aktivität der Citrat-Lyase von der Wachstumsphase abhängig ist (KULLA, 1973). Es ist immer ungünstig, die Änderung eines Parameters aus einem in sich unstatischen Zustand heraus zu messen. In der kontinuierlichen Kultur sind diese Probleme ausgeklammert, da das Wachstum konstant gehalten wird und sich damit alle hiervon abhängigen Parameter in einem stabilen Gleichgewicht befinden.

Häufig waren bei shift-Versuchen in der kontinuierlichen Kultur logarithmisch verlaufende Auswaschprozesse zu beobachten. Deswegen wurde in einigen Abbildungen eine halblogarithmische Darstellung gewählt.

2.1.1. Stoffwechselweg der Citrat-Vergärung bei E. aerogenes

Um einen Überblick über die Reaktionen zu erhalten, die der Citrat-Spaltung folgen, sollte zunächst der Stoffwechselweg des Citrats bei der Vergärung untersucht werden. Hierzu wurden bei Wachstum in der kontinuierlichen Kultur die Ausscheidungsprodukte qualitativ und quantitativ bestimmt. Dabei war von Interesse, ob sich der Gärverlauf bei Änderung des pH verschob und ob in der Phase der Anpassung an anaerobes Citrat-Wachstum ein anderer Stoffwechselweg vorlag als im "steady state". Für diese Versuche wurde das Wachstum der kontinuierlichen Kultur durch die C- und Energiequelle Citrat begrenzt. Dieses garantierte einen stets gleichbleibenden Citratumsatz. Um Verluste flüchtiger Gärendprodukte zu vermeiden, wurden Vorsichtsmaßnahmen ergriffen, die im methodischen Teil beschrieben sind.

Das Hauptausscheidungsprodukt war Acetat. Im Bereich von pH 6.1 bis pH 7.8 (unter- oder oberhalb dieses pH-Bereiches war das kontinuierliche Wachstum bei der gegebenen Durchflußrate von 0,196 Std^{-1} den Bakterien nicht mehr möglich) wurden pH unabhängig pro Mol verbrauchtem Citrat 1,7 bis 1,8 Mole Acetat gebildet. Das ließ kaum Platz für andere Ausscheidungsprodukte (außer Formiat bzw. H_2 und CO_2).

Abb. 1 zeigt die Acetat-Produktion beim Anpassen an anaerobes Citrat-Wachstum. Aus diesen Kurven geht hervor, daß von Anbeginn an knapp 2 Moleküle Acetat aus einem Molekül Citrat entstanden.

Die Formiat-Ausscheidung zeigte sich pH-abhängig (Abb. 2), wie das für Enterobakterien schon lange bekannt ist (TIKKA, 1935; GRAY et al., 1966). Diese Autoren zeigten, daß die Formiat-Hydrogen-Lyase im basischen reprimiert wird. Aus Abb. 2 geht hervor, daß bei pH 7.8 die Repression noch nicht vollständig war, da weniger Formiat (9,5 mM) ausgeschieden als Citrat (14 mM) verbraucht wurde.

Es ist bekannt, daß die Formiat-Dehydrogenase in E. coli zur Entfaltung von Aktivität Spuren von Selen, Molybdän und Eisen benötigt (PINSENT, 1954; LESTER und DeMOSS, 1971; ENOCH und LESTER, 1975). In das hier verwendete Medium wurde kein Selenit gegeben. Die vorhandenen Verunreinigungen reichten aber offensichtlich aus, um das Funktionieren des Formiat-Hydrogen-Lyase-Systems zu garantieren.

Interessant war das Induktionsverhalten des Formiat-spaltenden Systems bei Anpassung an anaerobes Citrat-Wachstum (Abb. 3). Es war bekannt, daß die Formiat-Hydrogen-Lyase in E. coli eine lange Induktionszeit hat (GRAY und GEST, 1965). Aus Abb. 3 geht hervor, daß diese Induktionsphase durch sauren pH enorm verkürzt werden konnte. Pyruvat-Formiat-Lyase, das Enzym, das die vorausgehende Reaktion katalysiert, ist in E. coli konstitutiv (HENNING, 1963) und wird direkt durch Sauerstoff reguliert (inaktiviert) (KNAPPE et al., 1974).

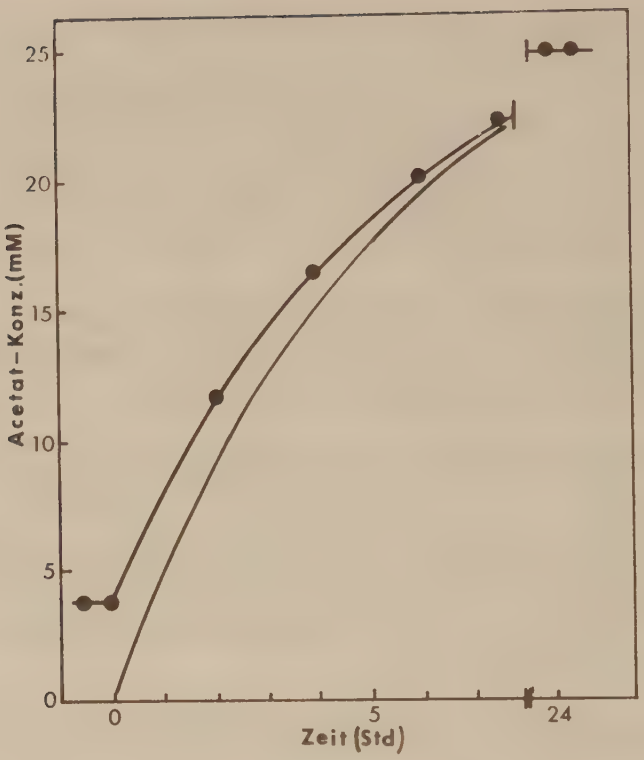


Abb. 1 Acetat-Ausscheidung beim Übergang vom aeroben zum anaeroben Citrat-Wachstum in der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes)

● Acetat-Konzentration

Die andere Kurve zeigt, wie sich die Acetat-Konzentration geändert hätte, wenn ab Zeitpunkt Null pro verbrauchtem Mol Citrat zwei Mole Acetat gebildet worden wären.

Medium: 2,7 g Citronensäure/l (14 mM); 1 g $(NH_4)_2SO_4$/l; pH 7,4. Zum Zeitpunkt Null wurde von aerob auf anaerob umgeschaltet. Durchflußrate: 0,196 Std^{-1}.

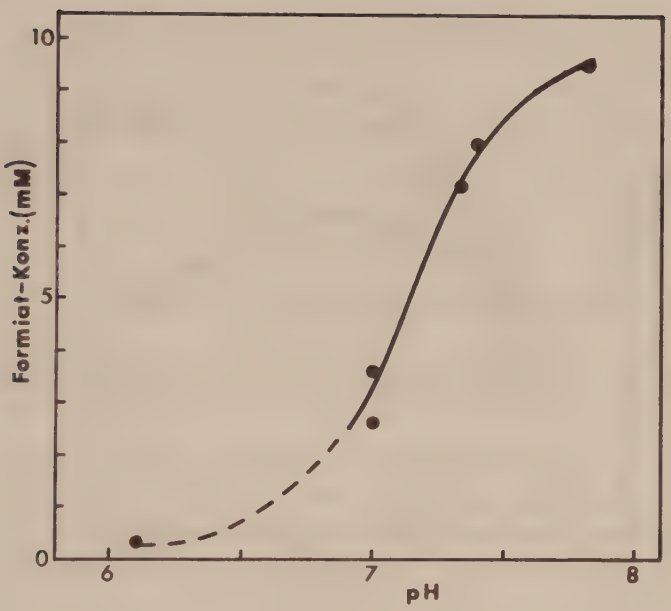


Abb. 2 pH-Abhängigkeit der Formiat-Ausscheidung

Die Bestimmung der Formiat-Konzentration erfolgte im "steady state" der kontinuierlichen Kultur. E. aerogenes wuchs anaerob auf Citrat. Verbraucht wurde 14 mM Citrat.

Medium: 2,7 g Citronensäure/l (14 mM); 1 g $(NH_4)_2SO_4$/l.

Durchflußrate: 0,196 Std^{-1}.

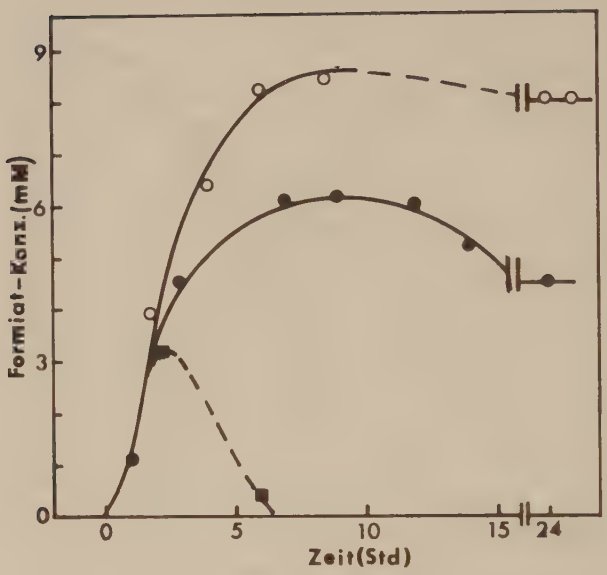


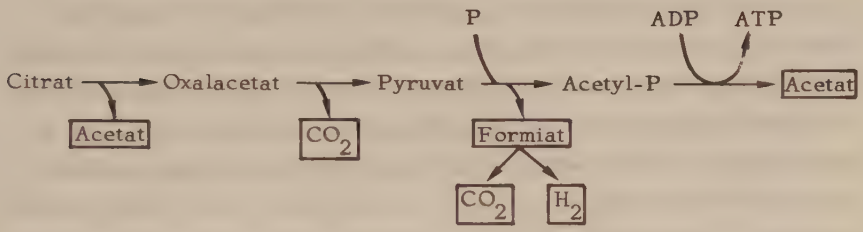
Abb. 3 Formiat-Ausscheidung beim Übergang vom aeroben zum anaeroben Citrat-Wachstum in der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes)

o Kultur bei pH 7,4
• Kultur bei pH 7,0
■ Kultur bei pH 6,1

Legende ansonsten wie Abb. 1

Es wurde noch auf eine Reihe weiterer Ausscheidungsprodukte geprüft (Acetoin, Diacetyl, Butandiol, D-Lactat, L-Lactat, Äthanol, Pyruvat, Succinat, Malat). Diese Bestimmungen wurden auch mit Überständen von "steady state" Kulturen durchgeführt, die durch NH_4^+ begrenzt waren. In allen Fällen waren diese Gärendprodukte nicht oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden (< 1 mM).

Der Gärverlauf von E. aerogenes bei anaerobem Wachstum auf Citrat läßt sich somit wie folgt formulieren:



(Ausscheidungsprodukte eingerahmt)

2.1.2. Umschaltexperimente in der kontinuierlichen Kultur

In mehreren Wachstumsumschaltexperimenten (anaerobes Wachstum ⇄ aerobes Wachstum) wurde das Verhalten der Citrat-Lyase beobachtet. Die Aktivität des antagonistischen Enzyms Citrat-Synthase wurde ebenfalls gemessen. Die Versuche wurden in kontinuierlicher Kultur durchgeführt. Hierzu muß gesagt werden, daß die eigentlich interessierende Phase die des Übergangs ("transient state", HARRISON und TOPIWALA, 1974) zwischen zwei sich unterscheidenden Gleichgewichtszuständen ("steady states") war. Dies war zugleich der Vorteil dieser Versuchsanordnung: beobachtet wurde die Zustandsänderung der Kultur aus einem stabilen und statischen Gleichgewicht heraus (Versuchsanordnung s. methodischer Teil).

Die Regulation der interessierenden Enzyme sollte so gestaltet sein, daß niemals beide Aktivitäten nebeneinander vorliegen, da das zum Aufbau eines "futile cycle" (HERS et al., 1970) an dieser zentralen Stelle des Stoffwechsels führen würde: Citrat-Lyase spaltet das Citrat, das durch die Citrat-Synthase energieaufwendig synthetisiert wurde. Außerdem wäre das Ablaufen des Citronensäurecyclus bzw. im Anaeroben der Syntheseweg zum Glutamat nicht mehr funktionsfähig. Es war zu vermuten, daß die Regulation

der Citrat-Lyase durch Acetylierung (Aktivierung) bzw. Desacetylierung (Inaktivierung) erreicht wurde.

Der Mechanismus der Aktivierung wurde durch SCHMELLENKAMP und EGGERER (1974) geklärt. Es gibt in der Zelle ein Enzym (Acetat : Enzym-Ligase), das mit Hilfe von ATP und Acetat inaktive Citrat-Lyase in die aktive Form überführt. Über die Regulation dieses aktivierenden Enzyms ist nichts bekannt. Möglich wäre eine allosterische Kontrolle oder wiederum eine kovalente Modifikation auf dieser höheren Stufe. Solche hierarchisch aufgebauten Regulationssysteme sind die Regel bei kovalent modifizierbaren Enzymen (SEGAL, 1973). Der Vorteil von Regulationskaskaden ist, daß jede Stufe zur Verstärkung des Regulationssignals führt. Somit empfiehlt sich diese Art der Kontrolle für Stellen im Stoffwechsel, die besonders strikt reguliert sein müssen.

Das Hauptziel bei den in diesem Kapitel geschilderten Versuchen war es, Informationen über die Inaktivierung der Citrat-Lyase zu erhalten. Zwei Inaktivierungsmechanismen, die sich gegenseitig ausschließen, wurden für möglich gehalten:

A. Reaktionsinaktivierung: Dieser Prozeß wäre dann kein in vitro-Artefakt, sondern stellte den physiologischen Inaktivierungsmechanismus dar. Der Angriffspunkt für die Regulation läge dann allein beim aktivierenden Enzym: ist dieses angeschaltet, so arbeitet es ständig gegen die Reaktionsinaktivierung an und hält die Citrat-Lyase aktiv. Wird es abgeschaltet, so inaktiviert sich das Enzym sehr schnell selbst durch Citrat-Umsatz. Die Verluste durch die ständige energieaufwendige Reacetylierung wären nur gering, da ein Mol Citrat-Lyase 34 000 Mole Citrat umsetzt, bis vollständige Reaktionsinaktivierung eintritt (SINGH und SRERE, 1971).

B. Nach dem Vorbild von Rhodopseudomonas gelatinosa würde die Desacetylierung durch ein inaktivierendes Enzym katalysiert (GIFFHORN und

GOTTSCHALK, 1975). Das Enzym von R. gelatinosa zeigt in vitro ebenfalls eine Reaktionsinaktivierung (KÜMMEL, BEHRENS und GOTTSCHALK, 1975), die aber in vivo sicher keine Rolle spielt, da sonst eine weitere inaktivierende Aktivität überflüssig wäre. Darüber hinaus zeigte GIFFHORN (1974), daß unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln das aktivierende Enzym in R. gelatinosa nicht arbeitet. Trotz Citrat-Umsatzes bleibt die Aktivität der Citrat-Lyase bei dieser Inkubation erhalten. Dieses Ergebnis schließt das Vorliegen einer in vivo Reaktionsinaktivierung in R. gelatinosa aus.

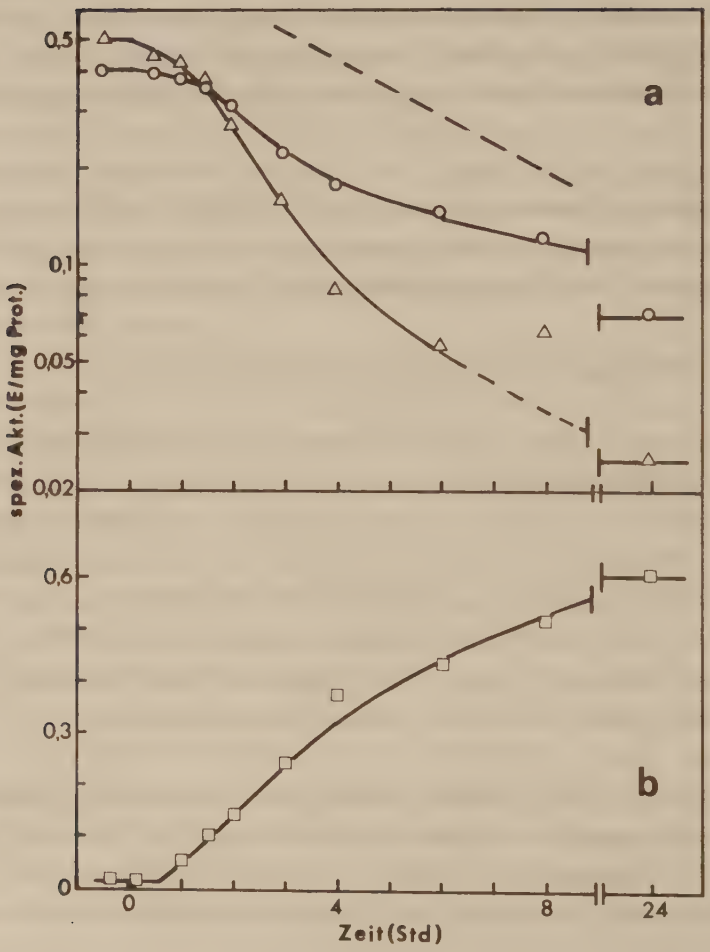
Das zu vermutende inaktivierende Enzym in E. aerogenes müßte jedoch anders reguliert sein als das in R. gelatinosa, da die Citrat-Lyase von E. aerogenes im Rohextrakt nicht desacetyliert wurde (s. Kapitel 2.1.6.).

2.1.2.1. Übergang von anaerobem auf aerobes Citrat-Wachstum

Wie Abb. 4 zeigt, ging die Citrat-Lyase-Aktivität bei aerobem Citrat-Wachstum nicht auf Null zurück. Sie wurde nur unvollständig und relativ langsam inaktiviert. Citrat-Synthase wurde induziert. Ihre Aktivität war notwendig, um einen kompletten Abbau des Citrat im Tricarbonsäure-Cyclus zu erlauben: Bei einem Durchgang durch den Cyclus entsteht Oxalacetat. Dieses wird in der Citrat-Synthase-Reaktion umgesetzt mit Acetyl-CoA, das in anaplerotischer Sequenz aus einem weiteren Molekül Oxalacetat über Pyruvat gewonnen wird. Erst damit ist der Cyclus geschlossen.

Dieser Versuch war nicht besonders günstig, um die Inaktivierung zu beobachten, da Citrat auch im Aeroben offensichtlich sowohl auf die Bildung als auch den Aktivitätszustand der Citrat-Lyase schwach induzierend wirkte. Eine strikte Inaktivierung der Citrat-Lyase war bei diesem shift auch nicht notwendig, da Citrat im Überschuß vorhanden war und Citrat-Lyase-Aktivität keinen Schaden anrichten konnte. Allerdings ist die Energieausbeute geringer, wenn auch im Aeroben das angebotene Citrat zum Teil der Gä-

rung entsprechend umgesetzt wurde.



2.1.2.2. Übergang von anaerobem Citrat- auf aerobes Glucose-Wachstum

Durch den zusätzlichen Substrat-Wechsel zum Zeitpunkt Null sollte eine höhere Inaktivierungsrate erzielt werden. Aus den eingangs genannten Gründen besteht in dieser shift-Phase Gefahr für den Aufbau eines "futile cycle", wenn die Citrat-Lyase nicht sofort inaktiviert wird. Dieser Versuch ist in Abb. 5 dargestellt. Die Citrat-Lyase wurde mit einer Halbwertszeit von ungefähr 30 min sehr zügig inaktiviert. Scheinbar ohne lag-Phase begann die Inaktivierung sofort mit maximaler Rate. Die Neubildung von Citrat-Lyase wurde eingestellt, was daraus ersichtlich ist, daß die Kurve für das Gesamt-Enzym (aktive + inaktive Citrat-Lyase; Aktivität nach Acetanhydrid-Behandlung) mit einer der Auswaschung entsprechenden Rate zurückging. Diese Gerade für das Gesamtenzym verlief jedoch etwas steiler, was ein Ausdruck für den allgemeinen Protein-Umschlag ("turn over") in der Zelle ist.

Abb. 4 Veränderung der Aktivität von Citrat-Lyase und -Synthase beim Übergang vom anaeroben zum aeroben Citrat-Wachstum in der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes)

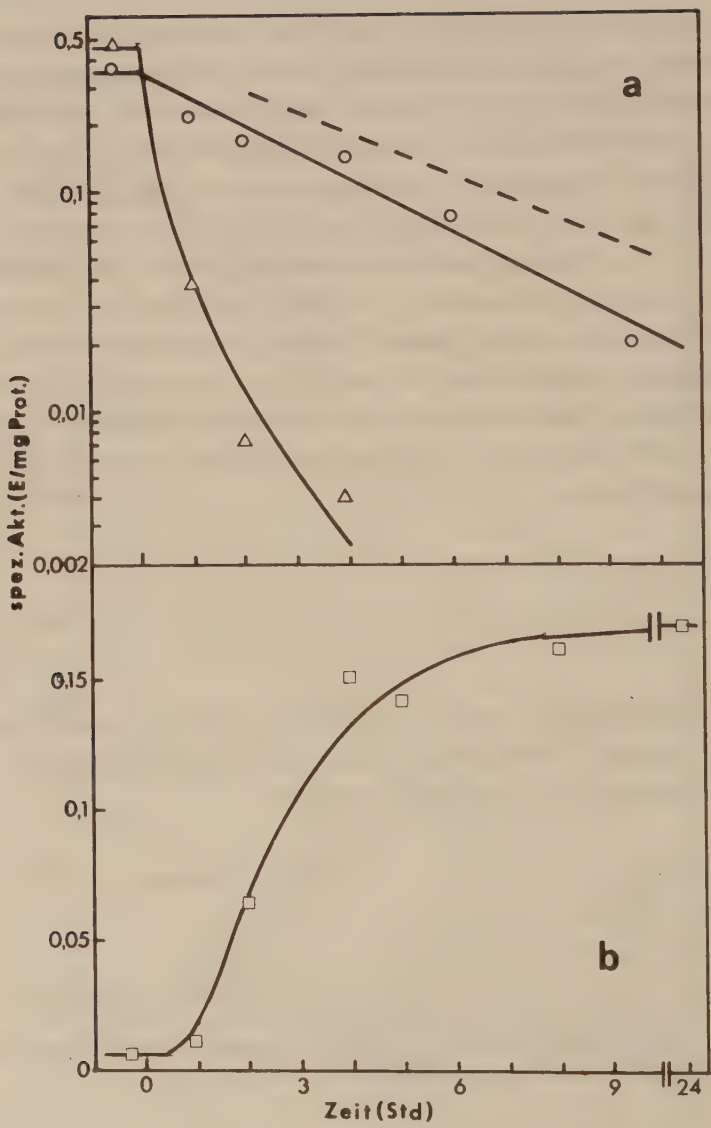
a: Citrat-Lyase b: Citrat-Synthase

Δ aktives Enzym

o aktives + inaktives Enzym

Medium: 8,1 g Citronensäure/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l (NH_4^+-Begrenzung)

Zum Zeitpunkt 0 wurde von anaerob auf aerob umgeschaltet. Die gestrichelte Linie entspricht der Auswaschrate von 0,196 Std^{-1}.


0,5
0,1
0,01
0,002
spez. Akt. (E/mg Prot.)
a
0,15
0,1
0,05
0
b
0
3
6
9
24
Zeit (Std)

Wie zu erwarten wurde die Citrat-Synthase-Bildung induziert (Abb. 5). Der "steady state level" lag tiefer als im zuvor beschriebenen Experiment (Citrat anaerob ⟶ Citrat aerob, Abb. 4). Es ist bekannt, daß Glucose eine katabolische Repression auf die Enzyme des Tricarbonsäure-Cyclus ausübt (MAGASANIK, 1961; GRAY, WIMPENNY und MOSSMANN, 1966).

2.1.2.3. In vivo Reaktivierung der Citrat-Lyase

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob einmal inaktivierte Citrat-Lyase von der Zelle reaktiviert werden kann. Abb. 6 zeigt, daß dies möglich war. Die Citrat-Lyase war durch dreistündiges aerobes Glucose-Wachstum vollständig inaktiviert worden. Zu diesem Zeitpunkt wurde wieder auf anaerobes Citrat-Wachstum umgestellt. Bis zur vollständigen Reaktivierung der Citrat-Lyase vergingen drei Stunden; der Prozeß benötigte weniger als eine halbe Stunde,um in Gang zu kommen. Bis die Neusynthese von Citrat-Lyase einsetzte, vergingen 1,5 Stunden.

Das Ergebnis dieser Versuche ist, daß die Zelle sich der Modifizierbarkeit der Citrat-Lyase bedient, um diese zu regulieren. Die Aktivierungs- und Inaktivierungsprozesse sind reversibel.

Abb. 5 Veränderung der Aktivität von Citrat-Lyase und -Synthase beim Übergang vom anaeroben Citrat- zum aeroben Glucose-Wachstum in der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes)

Legende wie Abb. 4.

Medium bis Zeitpunkt 0: 7 g Citronensäure/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l
(Begrenzung durch NH_4^+ und Citrat)

Medium ab Zeitpunkt 0: 7,2 g Glucose/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l
(NH_4^+-Begrenzung)

Zum Zeitpunkt 0 wurde der Kultur 7,2 g Glucose/l beigemischt.

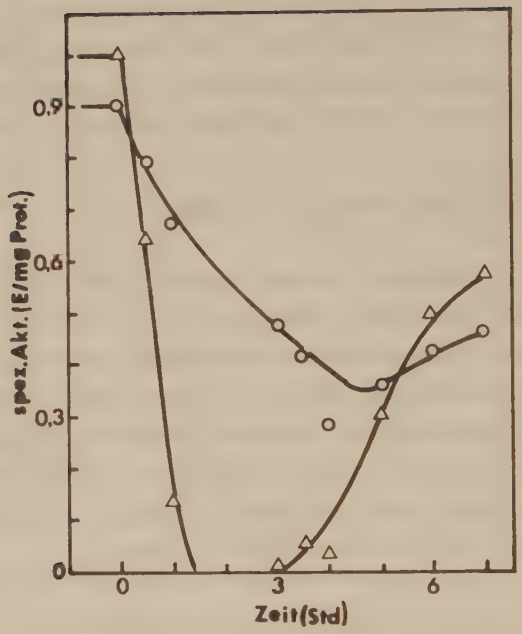


Abb. 6 In vivo Reaktivierung der Citrat-Lyase; kontinuierliche Kultur (E. aerogenes) mit folgenden Übergängen:

Zeitpunkt Stunde 0: anaerobes Citrat-Wachstum ⟶ aerobes Glucose-Wachstum

Zeitpunkt Stunde 3: aerobes Glucose-Wachstum ⟶ anaerobes Citrat-Wachstum

△ aktive Citrat-Lyase

o aktive + inaktive Citrat-Lyase

Medien: Bis Stunde 0: 7 g Citronensäure/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l
(Begrenzung durch NH_4^+ und Citronensäure)

Stunde 0 bis Stunde 3: 2,6 g Glucose/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l
(Begrenzung durch NH_4^+ und Glucose)

Ab Stunde 3: 7 g Citronensäure/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l
Zum Zeitpunkt Stunde 3 wurden der Kultur 7 g Citronensäure/l beigemischt.

2.1.2.4. Glutamat-Zusatz im in vivo Inaktivierungsexperiment

Wie bereits erwähnt, wird das Citrat-Lyase inaktivierende Enzym in R. gelatinosa durch den Glutamat-pool reguliert. Bei niedriger Glutamat-Konzentration wird physiologisch sinnvoll das inaktivierende Enzym aktiv (GIFFHORN und GOTTSCHALK, 1975). In einem in vivo Experiment sollte überprüft werden, ob die Regulation bei E. aerogenes ähnlich verläuft und die Citrat-Lyase-Inaktivierung durch Glutamat verhindert werden kann. In einem Umschaltexperiment wie es in Abb. 5 dargestellt wurde (Citrat anaerob ⟶ Glucose aerob), wurden 5 mM Glutamat zum einfließenden Medium zugegeben. Wie Abb. 7 zeigt, wurde hierdurch tatsächlich eine zeitliche Verschiebung der Inaktivierung um ungefähr eine Stunde erreicht. Aus der Kurve für die Glutamat-Konzentration im Fermenter während dieses Versuchs geht hervor, daß diese Aminosäure von den Zellen unter den aeroben besser als unter den vorausgegangenen anaeroben Bedingungen genutzt werden konnte. Der begrenzende Faktor während dieser kontinuierlichen Kultur sollte NH_4^+ sein, die Zellen nutzten jedoch das Glutamat als zusätzliche Stickstoffquelle. Nach dem Umschalten kam es als Folge des höheren Glutamat-Verbrauchs zu einem erheblichen Anstieg ("shift up") der Zellkonzentration (von $Ex_{500\ nm}$ 1,35 auf 2,8 fünf Stunden nach dem Umschalten). Die Kontinuität des Wachstums war somit durchbrochen.

Im nächsten Versuch wurde diese Schwierigkeit dadurch umgangen, daß ein anderer Faktor des Mediums als wachstumsbegrenzend eingestellt wurde. Im Versuch, der in Abb. 8 dargestellt ist, wurde das gleiche Experiment (Citrat anaerob ⟶ Glucose aerob; 5 mM Glutamat) unter Sulfat-Begrenzung durchgeführt. Hier verlief die Inaktivierung wie im Vergleichsversuch in Abb. 5.

Somit wirkte Glutamat im in vivo Experiment nicht als Effektor auf die Citrat-Lyase-Inaktivierung.

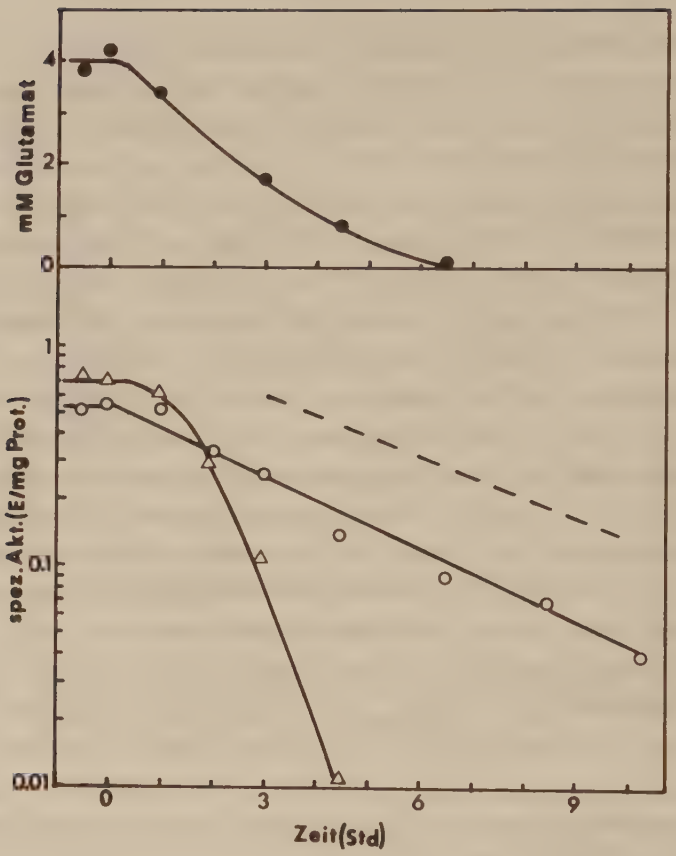


Abb. 7 In vivo Inaktivierung der Citrat-Lyase unter Glutamat-Zusatz; Übergang vom anaeroben Citrat- zum aeroben Glucose-Wachstum in der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes)

△ aktive Citrat-Lyase; ○ aktive + inaktive Citrat-Lyase
● Glutamat-Konzentration in der Kultur

Medien wie in Abb. 5. Außerdem enthielten beide Medien 5 mM Glutamat. Zum Zeitpunkt 0 wurden der Kultur 7,2 g Glucose/l beigemischt. Die gestrichelte Linie entspricht der Auswaschrate von 0,196 Std^{-1}.

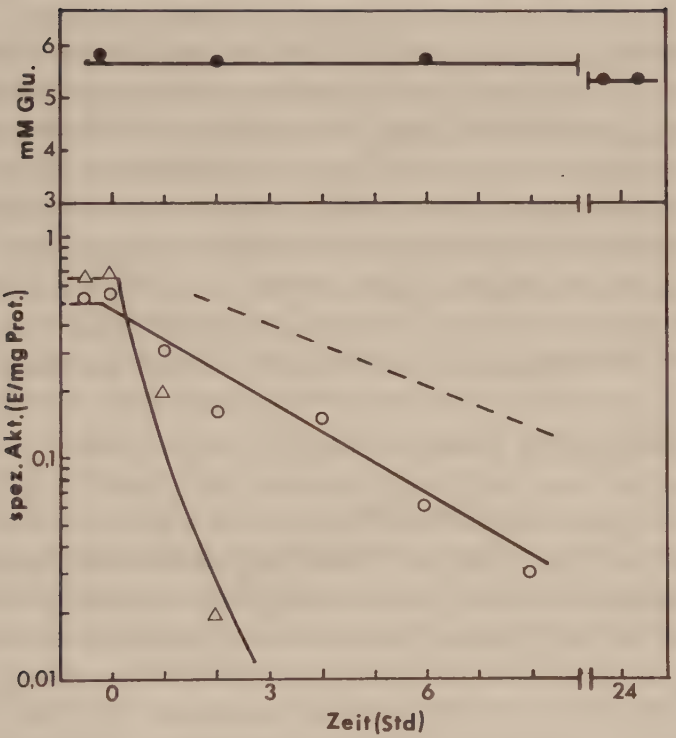


Abb. 8 In vivo Inaktivierung der Citrat-Lyase unter Glutamat-Zusatz; Sulfat-Begrenzung der kontinuierlichen Kultur

Medium bis Zeitpunkt 0: 5,2 g Citronensäure/l; 0,4 g $(NH_4)_2SO_4$/l; 8 mg Na_2SO_4 . 10 H_2O/l; 5 mM Glutamat (Begrenzung durch SO_4^{2-} und Citrat)

Medium ab Zeitpunkt 0: Statt Citronensäure 7,2 g Glucose/l (Begrenzung durch SO_4^{2-})

Legende ansonsten wie Abb. 7.

2.1.2.5. Übergang vom anaeroben Citrat- auf anaerobes Glucose-Wachstum

Das Verhalten der Citrat-Lyase bei diesem Übergang ist in Abb. 9 dargestellt. Es überrascht sehr, daß das Enzym unter diesen Bedingungen (anaerobes Glucose-Wachstum) nicht inaktiviert wurde; die Aktivität ging mit der Auswaschrate zurück. Citrat-Synthase wurde induziert, hier nur bis zu einem relativ geringen level, da das Enzym unter diesen Bedingungen nur eine anabolische Funktion im Glutamatsynthese-Weg hat. Obwohl Citrat-Synthase-Aktivität für diese Funktion benötigt wird, wurde der Antagonist Citrat-Lyase nicht inaktiviert. Das heißt, hier passiert genau das, was - wie in der Einführung gesagt - unbedingt hätte verhindert werden müssen: Citrat-Synthase und Citrat-Lyase-Aktivität liegen in dieser Übergangsphase nebeneinander vor. Es muß zu einem "futile cycle" kommen.

Der Verlauf der Kurve für die Zelldichte während dieses Umschalt-Experiments (Abb. 10) unterstützt diese Vermutung. Es kam zu erheblichen Wachstumsstörungen, die sich in einem Absinken der optischen Dichte der kontinuierlichen Kultur äußerten. Erst nach vier bis fünf Stunden trat eine Stabilisierung ein und allmählich kehrte die Zelldichte auf den normalen Wert zurück. Hierzu paßt, daß der Wachstums-begrenzende Faktor NH_4^+ von Stunde 0 bis 4 im Fermenter im Überschuß nachweisbar war. In allen bisher geschilderten Umschaltversuchen, auch im Vergleichsversuch Citrat anaerob ⟶ Glucose aerob, traten keine derartigen Schwierigkeiten bei der Adaptation an die neuen Wachstumsbedingungen auf: die Zelldichte blieb konstant, der wachstumsbegrenzende Faktor war im Fermenter zu keiner Zeit nachweisbar. Das zeigt, daß die Schwierigkeiten nicht bei der Glucose-Aufnahme in die Zelle oder bei Enzymen der Glycolyse lagen. Wenn also die Adaptationsschwierigkeit bei dem oben geschilderten Experiment daran lag, daß infolge eines "futile cycle" um das Citrat die Zellen unter Glutamat-Mangel gerieten, so sollte diese Schwierigkeit durch Zugabe dieser Aminosäure zum Medium überwunden werden können. Da aber Glutamat, wie in Versuch Abb. 7 gezeigt, als Stickstoffquelle dienen und damit die

NH_4^+-Wachstumsbegrenzung stören konnte, wurde α-Ketoglutarat als stickstofffreier Vorläufer des Glutamats im Experiment eingesetzt. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, nahmen die Zellen das α-Ketoglutarat (2 mM) bei anaerobem Citrat-Wachstum nicht auf. Lediglich in der Übergangsphase zwischen anaerobem Citrat- und anaerobem Glucose-Wachstum - also in der Phase, für die ein Glutamat-Bedürfnis als Folge des "futile cycle" postuliert worden war - wurde bis zu 0,25 mM α-Ketoglutarat verbraucht. Das Absinken der optischen Dichte konnte, wie Abbildung 10 zeigt, dadurch nicht vollständig abgefangen werden. Jedoch wird ersichtlich, daß der Rückgang der Zelldichte weniger gravierend war und zügiger ausgeglichen werden konnte. Wahrscheinlich konnte das α-Ketoglutarat nicht schnell genug aufgenommen werden, um die Verluste voll zu kompensieren.

Als Kontrollversuch wurde das Umschaltexperiment anaerob Citrat ⟶ aerob Glucose gewählt. Hier wurde die Citrat-Lyase inaktiviert (Abb. 5), es sollte also zu keinem "futile cycle" kommen und kein Glutamat bzw. α-Ketoglutarat-Bedürfnis entstehen können. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, wurde das in diesem Versuch angebotene α-Ketoglutarat auch in der shift-Phase nicht aufgenommen. Diese Kontrolle unterstützt somit das oben Gesagte.

In Abb. 10 fällt weiterhin auf, daß die α-Ketoglutarat-Konzentration in der Kultur bei aerobem und anaerobem Glucose-Wachstum höher war als im einfließenden Medium. Der Grund hierfür ist eine α-Ketoglutarat-Ausscheidung bei Glucose-Wachstum unter NH_4^+-Begrenzung. Dies ist sicher ein Ausdruck für einen Überflußstoffwechsel bei Überschuß der C-Quelle. Die gleiche Beobachtung wurde von NEIJSSEL und TEMPEST (1975) gemacht.

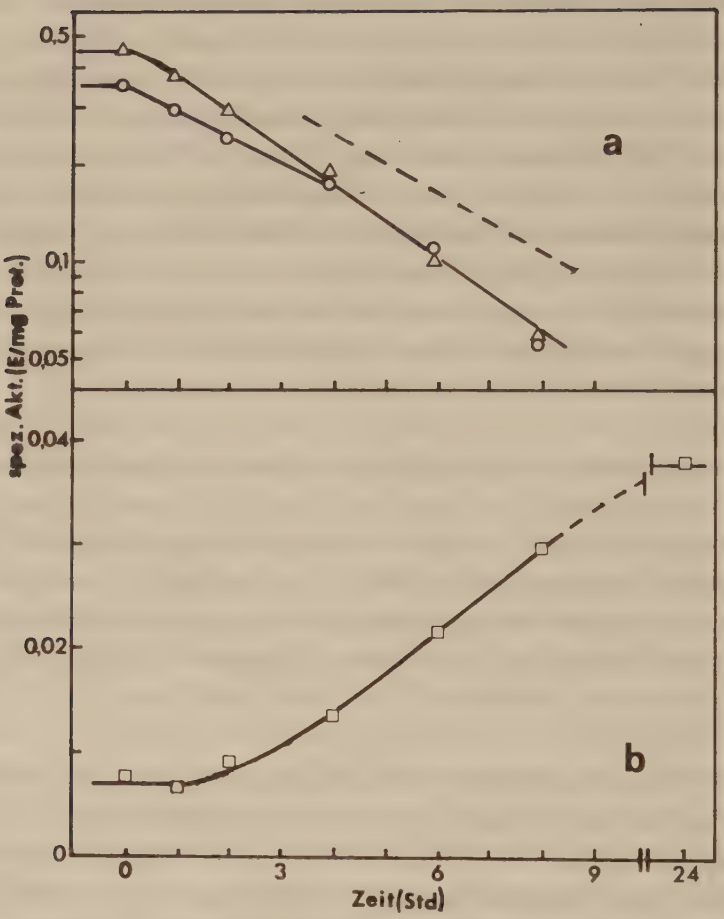


Abb. 9 Veränderung der Aktivität von Citrat-Lyase und -Synthase beim Übergang vom anaeroben Citrat- zum anaeroben Glucose-Wachstum in der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes)

Legende wie Abb. 4.

Medien wie Abb. 5.

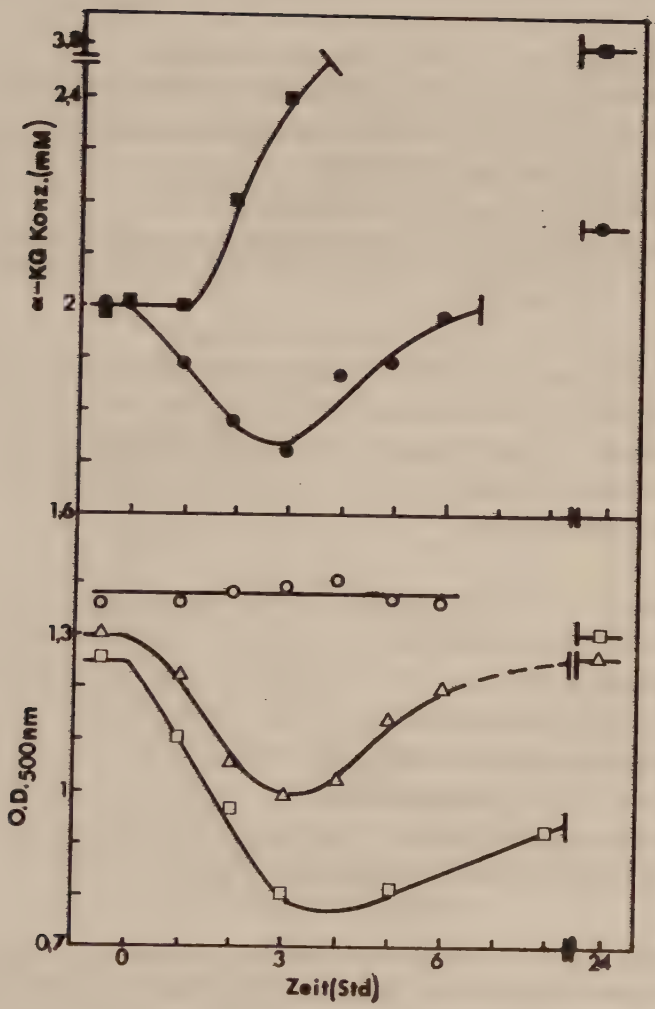


Abb. 10 Übergang vom anaeroben Citrat- auf anaerobes Glucose-Wachstum; Ergänzungen zu Abb. 9

Legende siehe Seite 24.

Legende zu Abb. 10:

□ Bakteriendichte (O.D. 500 nm) bei diesem Übergang
△ Bakteriendichte (O.D. 500 nm) beim gleichen Übergang, aber mit 2 mM α-Ketoglutarat im Medium
● α-Ketoglutarat-Konzentration in der Kultur bei diesem Übergang (2 mM α-Ketoglutarat im Medium)
o Bakteriendichte beim Übergang vom anaeroben Citrat- auf aerobes Glucose-Wachstum (wie in Abb. 5)
■ α-Ketoglutarat-Konzentration in der Kultur beim gleichen Übergang (anaerob Citrat ⟶ aerob Glucose); im Medium waren 2 mM α-Ketoglutarat.

Es bleibt die Frage, warum die Citrat-Lyase bei dem Umschalt-Vorgang Citrat anaerob ⟶ Glucose anaerob nicht inaktiviert wurde. Ausgehend von den beiden für möglich gehaltenen Inaktivierungsmechanismen, wie sie in der Einführung zu diesem Kapitel (S.10) beschrieben wurden, bieten sich folgende Erklärungen an:

Möglichkeit A: Der physiologische Inaktivierungsmechanismus ist die Reaktionsinaktivierung. Da bei anaerobem Glucose-Wachstum die Citrat-Lyase nicht inaktiviert wurde (Abb. 9), muß angenommen werden, daß das aktivierende Enzym angeschaltet blieb und die sich reaktionsinaktivierende Citrat-Lyase ständig reacetylierte. Dabei muß aber vorausgesetzt werden, daß der Citrat-pool bzw. die Citrat-Produktion in der Zelle groß genug war, um der Citrat-Lyase genügend Substrat für die Reaktionsinaktivierung zu liefern. Auf diese Frage wird weiter unten noch eingegangen.

Möglichkeit B: Reaktionsinaktivierung spielt in der Zelle keine Rolle; sie ist ein in vitro Artefakt. Die Inaktivierung wird durch ein inaktivierendes Enzym katalysiert. Dann muß postuliert werden, daß dieses Enzym unter der Bedingung anaeroben Glucose-Wachstums abgeschaltet blieb.

Der folgende Versuch sollte zeigen, ob bei anaerobem Glucose-Wachstum das aktivierende Enzym ab- oder angeschaltet war und so eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten bringen.

2.1.2.6. Ist bei anaerobem Glucose-Wachstum das aktivierende Enzym angeschaltet?

Dieser Versuch ist in Abb. 11 dargestellt. Zunächst wurde die Citrat-Lyase durch dreistündiges aerobes Glucose-Wachstum inaktiviert. Anschließend wurde auf anaerobes Glucose-Wachstum umgeschaltet. Die Citrat-Lyase wurde nicht reaktiviert, ein Beweis dafür, daß das aktivierende Enzym unter der Wachstumsbedingung "anaerob Glucose" nicht angeschaltet war.

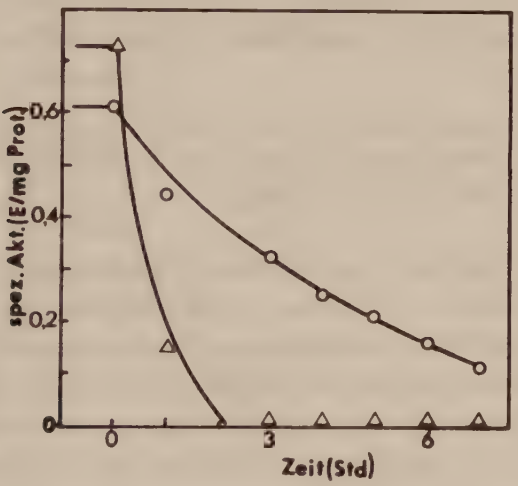


Abb. 11 Verhalten der Citrat-Lyase in der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes) bei folgenden Übergängen:

Zeitpunkt Stunde 0: anaerobes Citrat-Wachstum → aerobes Glucose-Wachstum
Zeitpunkt Stunde 3: aerobes Glucose-Wachstum → anaerobes Glucose-Wachstum

△ aktive Citrat-Lyase; o aktive + inaktive Citrat-Lyase

Medium bis Stunde 0: 7 g Citronensäure/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l
(Begrenzung durch NH_4^+ und Citronensäure)
Medium ab Stunde 0: 7,2 g Glucose/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l
(Begrenzung durch NH_4^+)

Zum Zeitpunkt 0 wurden der Kultur 7,2 g Glucose/l beigemischt.

Dieses Ergebnis ist nicht in Einklang zu bringen mit der obigen Hypothese (Möglichkeit A), daß Reaktionsinaktivierung der physiologische Inaktivierungsmechanismus ist. Es ist somit ein Argument für die Alternative (Möglichkeit B) und das Vorhandensein eines inaktivierenden Enzyms.

Diese Folgerung gilt jedoch nur mit der Einschränkung, die oben bereits angesprochen wurde: Es ist nicht klar, ob während des Umschaltens auf das anaerobe Glucose-Wachstum in der Zelle genügend Citrat produziert wurde, um der Citrat-Lyase eine zügige Reaktionsinaktivierung zu erlauben. Unter geänderten Bedingungen sollte das im nächsten Versuch sichergestellt werden.

2.1.2.7. Übergang von anaerobem Citrat-Wachstum auf anaerobes Wachstum mit Citrat plus Glucose

Aus Abb. 12 geht hervor, daß Citrat und Glucose nach dem shift parallel vergoren wurden. Es ist bekannt, daß im Anaeroben die von der Glucose ausgehende katabolische Repression nur schwach ausgeprägt ist (ABOUD und BURGER, 1972). Abb. 12 zeigt weiterhin, daß die Citrat-Lyase nicht inaktiviert wurde. Unter der Voraussetzung, daß das aktivierende Enzym unter dieser Bedingung (anaerobes Wachstum auf Glucose plus Citrat) abgeschaltet ist, wäre das der endgültige Beweis, daß es in der Zelle keine Reaktionsinaktivierung gibt. Im nächsten Versuch sollte diese Voraussetzung in direkter Anlehnung an den Versuch Abb. 11 geprüft werden.

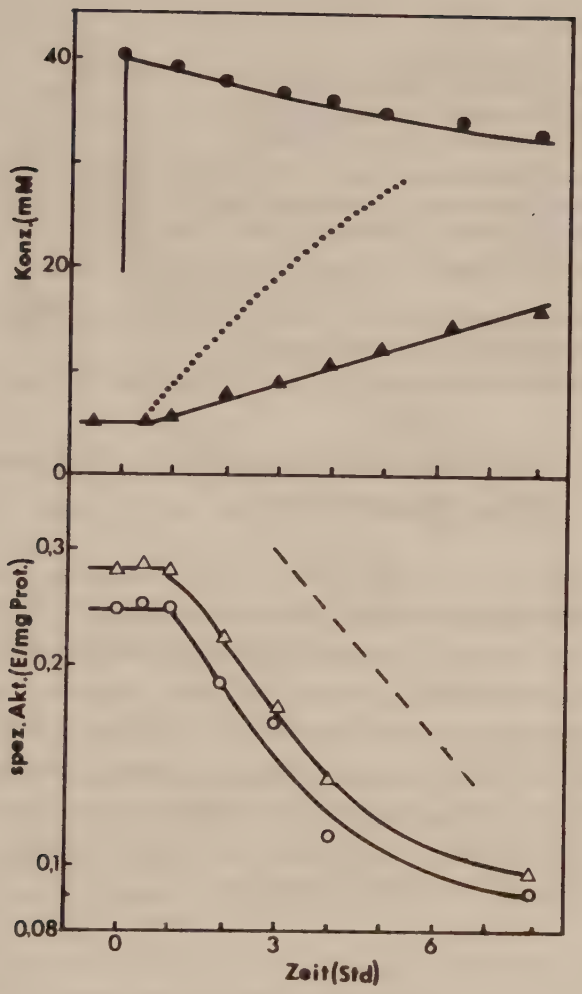


Abb. 12 Übergang vom anaeroben Citrat-Wachstum zum anaeroben Wachstum auf Citrat plus Glucose in der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes)

Legende siehe Seite 28.

Legende zu Abb. 12:

o aktive Citrat-Lyase
Δ aktive + inaktive Citrat-Lyase
● Glucose-Konzentration in der Kultur
▲ Citrat-Konzentration in der Kultur

Die gestrichelte Linie entspricht der Auswaschrate von 0,196 Std^{-1}. Die gepunktete Linie zeigt, wie sich die Citrat-Konzentration geändert hätte, wenn vom Zeitpunkt 1/2 Stunde an kein Citrat mehr verbraucht worden wäre.

Medium bis Zeitpunkt 0: 8,1 g Citronensäure/l (42 mM);
0,133 g $(NH_4)_2SO_4$/l
Medium ab Zeitpunkt 0: zusätzlich 7,2 g Glucose/l (40 mM)
(In beiden Medien NH_4^+-Begrenzung)

Zum Zeitpunkt 0 wurde der Kultur 7,2 g Glucose/l beigemischt.

2.1.2.8. Ist bei anaerobem Wachstum auf Citrat plus Glucose das aktivierende Enzym angeschaltet?

Dieser Versuch ist in Abb. 13 dargestellt. Während des dreistündigen aeroben Wachstums auf Citrat plus Glucose wurde die Citrat-Lyase inaktiviert. Nach dem anschließenden Übergang zu anaerobem Wachstum bei Beibehaltung des Mediums (Citrat plus Glucose), wurde die Citrat-Lyase reaktiviert. Das heißt, daß bei anaerobem Wachstum auf Citrat plus Glucose das aktivierende Enzym angeschaltet war. Somit ist die Voraussetzung für die Schlußfolgerung, die im vorausgegangenen Versuch gemacht wurde, hinfällig. Es kann aus diesem Versuch nicht gefolgert werden, daß es in der Zelle keine Reaktionsinaktivierung gibt.

Auf die Neusynthese von Citrat-Lyase hatte der shift von aerob nach anaerob nur schwach induzierende Wirkung, wie der kleine, vorübergehende Anstieg der Kurve für die Gesamt-Citrat-Lyase (aktiv + inaktiv) bei Stunde 4 zeigte.

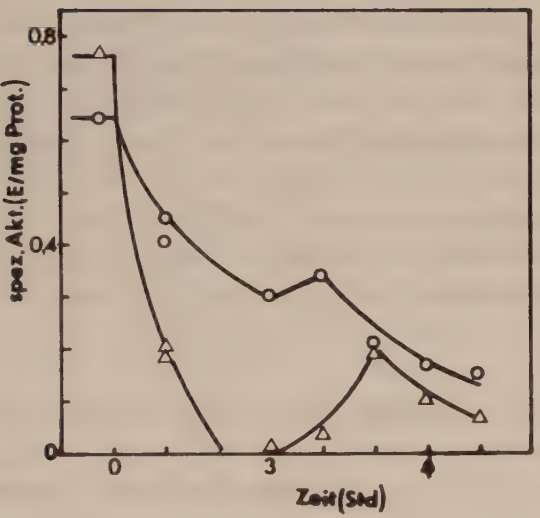


Abb. 13 Verhalten der Citrat-Lyase in der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes) bei folgenden Übergängen:

Zeitpunkt Stunde 0: anaerobes Citrat-Wachstum ⟶ aerobes Wachstum mit Citrat plus Glucose

Zeitpunkt Stunde 3: aerob ⟶ anaerob mit Citrat + Glucose

△ aktive Citrat-Lyase; o aktive + inaktive Citrat-Lyase

Medium bis Zeitpunkt 0: 8,1 g Citronensäure/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l

Medium ab Zeitpunkt 0: zusätzlich 7,2 g Glucose/l
(In beiden Medien NH_4^+-Begrenzung)

2.1.2.9. Citrat-Produktion und Reaktionsinaktivierung

In den Versuchen, die in Abb. 9 und 11 dargestellt sind, wurde gezeigt, daß unter anaeroben Bedingungen die Citrat-Lyase auch dann nicht inaktiviert wurde, wenn das aktivierende Enzym abgeschaltet war. Unter der Voraussetzung, daß genügend Citrat in der Zelle vorhanden war, mit dem

sich die Citrat-Lyase hätte reaktionsinaktivieren können, wäre dies der Beweis, daß Reaktionsinaktivierung in der Zelle keine Rolle spielt. Die Unsicherheit sollte dadurch beseitigt werden, daß diese Versuche wiederholt wurden mit Citrat als zusätzlicher C- und Energiequelle im Glucose-Medium (Abb. 12 und 13). Diese Versuche blieben jedoch aussagelos, da bei anaerobem Wachstum auf Glucose plus Citrat das aktivierende Enzym angeschaltet war (Abb. 13). In diesem Kapitel soll nun indirekt gezeigt werden, daß im Umschaltexperiment Citrat anaerob ⟶ Glucose anaerob (Abb. 9) sowohl die Citrat-Produktion in der Zelle als auch der Citrat-Umsatz durch die Citrat-Lyase genügt hätten, um das Enzym zu reaktionsinaktivieren.

Eine Kalkulation erlaubt der in Abb. 10 dargestellte Versuch. Hier sank die α-Ketoglutarsäure-Konzentration in den ersten drei Stunden nach dem Umschalten auf anaerobes Glucose-Wachstum von den angebotenen 2 mM auf 1,75 mM; die Kultur hatte also 0,25 µMole pro ml verbraucht. Dieser Bedarf war dadurch entstanden, daß die aktive Citrat-Lyase das Citrat zersetzte, das von der Citrat-Synthase zum Zwecke der Glutamat-Synthese gebildet wurde. Die in der Kultur vorhandene Citrat-Lyase muß also in diesen drei Stunden mindestens 0,25 µMole Citrat pro ml umgesetzt haben. Zur Kontrolle: Aus Abb. 9 b kann man kalkulieren, daß die Citrat-Synthase in den interessierenden drei Stunden 1,5 µMole Citrat pro mg Protein bilden konnte (Dabei setzt man voraus, daß die Citrat-Synthase in vivo dieselbe spezifische Aktivität zeigt wie im Rohextrakt). Die Kultur hatte einen Proteingehalt von 0,17 mg/ml. Somit konnten 0,26 µMole Citrat pro ml Kulturvolumen gebildet werden.

Die Kultur hatte eine spezifische Citrat-Lyase-Aktivität von 0,47 E/mg Protein (Abb. 9). Diese Aktivität war mit Zn^{2+} als dem zur Reaktion notwendigen zweiwertigen Metallion gemessen worden. Bei Mg^{2+}-Katalyse (physiologisch sinnvoll) ergibt sich nach SINGH und SRERE (1971) eine um den Faktor 2,1 höhere Aktivität, also 0,99 E Citrat-Lyase pro mg Protein.

Da die Kultur einen Proteingehalt von 0,17 mg/ml hatte, lag die Citrat-Lyase-Konzentration bei 0,17 E pro ml Kulturvolumen. Da nach SINGH und SRERE (1971) eine Einheit Citrat-Lyase bei Mg^{2+}-Katalyse nur 1 µMol Substrat umsetzen kann bis vollständige Reaktionsinaktivierung eingetreten ist, hätte die Citrat-Lyase der Kultur nur 0,17 µMole Citrat pro ml Kulturvolumen umsetzen können. In den ersten drei Stunden wurden jedoch, wie oben gezeigt, mindestens 0,25 µMole Citrat pro ml Kulturvolumen umgesetzt, d. h., bis zu diesem Zeitpunkt hätte die Citrat-Lyase schon vollständig reaktionsinaktiviert sein müssen. Tatsächlich geht aber aus Abb. 9 hervor, daß die Citrat-Lyase in diesem Versuch (Umschalten auf anaerobes Glucose-Wachstum) auch nach 8 Stunden noch keine Inaktivierung aufwies. Diese Beobachtung ist nicht in Einklang zu bringen mit einem Inaktivierungsmechanismus, der auf Reaktionsinaktivierung beruht.

2.1.2.10. Zusammenfassung und Neuorientierung

Die bisher geschilderten Versuche zeigen klar, daß es in der Zelle keine Reaktionsinaktivierung gibt. Da die Inaktivierung der Citrat-Lyase durch Inkubation mit Oxalacetat reaktionsmechanistisch der gleiche Vorgang ist wie die Reaktionsinaktivierung (s. Einleitung), scheidet dieser Prozeß ebenfalls als physiologisches Inaktivierungsprinzip aus. Als Alternative bleibt die Annahme, daß die in vivo Inaktivierung der Citrat-Lyase durch ein Regulationsenzym katalysiert wird, so wie das für R. gelatinosa von GIFFHORN und GOTTSCHALK (1975) gezeigt wurde. Hier entstehen jedoch zwei Probleme:

a) Die Aktivität eines Citrat-Lyase inaktivierenden Enzyms konnte in zellfreien Extrakten von E. aerogenes - anders als bei R. gelatinosa - nicht nachgewiesen werden (Kapitel 2.1.6.). Allerdings kann das Nichtauffinden einer Enzymaktivität nicht der Beweis für seine Nichtexistenz sein.

b) Sollte es ein inaktivierendes Enzym in E. aerogenes geben, so ist dieses Enzym offensichtlich nicht wie in R. gelatinosa über den Glutamatpool reguliert. Beim Übergang vom anaeroben Citrat zu anaerobem Glucose-Wachstum (Abb. 9) gerieten die Zellen unter massiven Glutamatmangel, wie das in Abb. 10 gezeigt wurde. Trotzdem wurde das zu vermutende inaktivierende Enzym nicht aktiv. Warum läßt die Zelle dieses wichtige intrazelluläre Signal außer acht? Es scheint so, als wäre die Inaktivierung an das Erscheinen des Sauerstoffs gebunden. Entweder könnte der Sauerstoff direkt inaktivierend wirken oder über einen von ihm abhängigen Prozeß, wie ihn die Atmungskette darstellt. Zu vermuten wäre dann eine Kopplung zwischen Elektronentransport und/oder Phosphorylierungsvorgängen in der Membran mit der Inaktivierung der Citrat-Lyase. Wenn es eine solche Kopplung gäbe, so sollte auch eine Inaktivierung eintreten, wenn ein anderer Elektronenendacceptor als Sauerstoff angeboten würde.

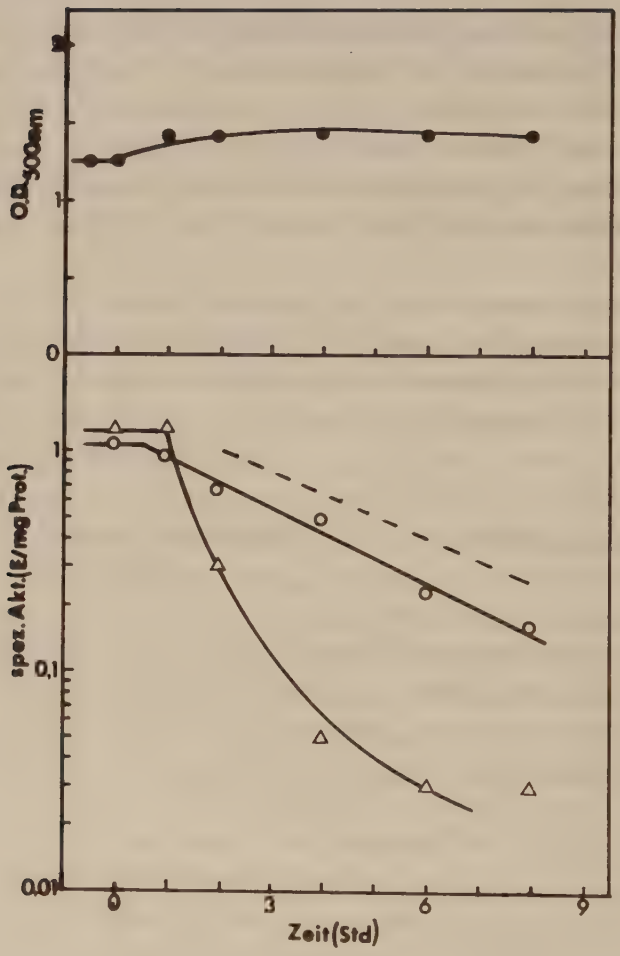
2.1.2.11. Übergang von anaerobem Citrat- auf anaerobes Glucose-Wachstum mit Nitrat

Nitrat kann den Enterobakterien bei Anaerobiose als terminaler Acceptor einer Elektronentransportkette dienen. E. aerogenes reduziert pro Mol Glucose ein halbes Mol Nitrat zu Ammonium. Der Ertragskoeffizient steigt dadurch auf das Doppelte an (HADJIPETROU und STOUTHAMER, 1965). Das Nitrat bzw. das entstehende Ammonium kann der Zelle als Stickstoffquelle dienen. Deswegen mußte in der kontinuierlichen Kultur bei diesem Versuch die Begrenzungsbedingung geändert werden. Vom Zeitpunkt 0 an wurde eine Begrenzung durch die C-Quelle Glucose eingeführt (Abb. 14). Um eine Änderung in der optischen Dichte und damit verbunden eine Diskontinuität der Wachstumsrate zu vermeiden, wurde halb so viel Glucose eingesetzt, wie sonst bei vergleichbarem Wachstum ohne Nitrat verbraucht wurde. Die Kurve für die Bakteriendichte (Abb. 14) zeigt, daß keine signifikanten Änderungen durch den shift eintraten. Man beachte, daß der Ver-

lust in der optischen Dichte, wie er beim Umschalten auf anaerobes Glucose-Wachstum beobachtet wurde (Abb. 10), ausblieb.

Wie Abb. 14 zeigt, wurde nach dem Umschalten auf anaerobes Glucose-Wachstum mit Nitrat die Citrat-Lyase inaktiviert. Die Dynamik dieses Prozesses war langsamer als im Vergleichsversuch, in dem auf aerobes Glucose-Wachstum umgeschaltet wurde (Abb. 5). Außerdem trat hier eine lag-Phase von einer Stunde auf, bevor die Inaktivierung begann. Dieser Zeitverlust kann mit der Induktionsphase für die Nitrat-Reduktase erklärt werden (SHOWE und DeMOSS, 1968; PICHINOTY und D'ORNANO, 1961).

Dieser Versuch unterstützt die oben geäußerte Vermutung, daß die Inaktivierung der Citrat-Lyase gekoppelt sein könnte an das Ablaufen der Respirationskette. Seine besondere Aussagekraft erhält dieses Ergebnis dadurch, daß NO_3^- in der Zelle keineswegs als Ersatz für den Sauerstoff agiert, wie der Ausdruck "Nitrat-Atmung" vermuten lassen könnte. Wie dem Übersichtsartikel von PAYNE (1973) zu entnehmen ist, macht E. coli unter Nitratatmungsbedingungen keinen Gebrauch vom Tricarbonsäure-Cyclus. Die anaeroben Stoffwechselwege bleiben weitgehend erhalten, wenn sich auch die Gärungsendprodukte ändern: Wasserstoff, Formiat, Äthanol, Succinat und Lactat werden bei anaerobem Wachstum auf Glucose plus Nitrat nicht mehr oder nur in geringerem Maße gebildet, CO_2- und Acetat-Produktion steigen an; Pyruvat wird ebenfalls ausgeschieden. Als Elektronendonator für die Nitrat-Reduktion dient fast ausschließlich Formiat.


O.D.500nm
1
0
spez. Akt.(E/mg Prot.)
1
0,1
0,01
0
3
6
9
Zeit(Std)

2.1.2.12. Anaerobes Wachstum auf Citrat plus Nitrat

Wenn Nitrat als Elektronenendacceptor wie oben gezeigt zur Inaktivierung der Citrat-Lyase führt, so stellt sich die Frage, was passiert, wenn man den Zellen Citrat plus NO_3^- unter anaeroben Bedingungen anbietet. Unter Umständen könnten die Zellen in eine kritische Situation geraten, da aktive Citrat-Lyase in diesem Fall zum Wachstum benötigt wird. In Abb. 15 ist ein solcher Wachstumsversuch dargestellt. Tatsächlich war zu beobachten, daß die auf Citrat plus Nitrat wachsende Kultur unter Wachstumshemmung geriet.

Die Wachstumsrate, die sich nach 5 Stunden einstellte, war nur ein Fünftel so groß wie die der Kultur, die Citrat ohne Nitrat vergor (Tabelle 1). Die Kontrolle zeigt, daß das Wachstum auf Glucose wie zu erwarten durch Nitrat beschleunigt wurde.

Abb. 14 Veränderung der Aktivität der Citrat-Lyase beim Übergang vom anaeroben Citrat- auf anaerobes Glucose-Wachstum plus Nitrat in der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes)

• Bakteriendichte (O.D. 500 nm)
△ aktive Citrat-Lyase
o aktive + inaktive Citrat-Lyase

Medium bis Zeitpunkt 0: 7 g Citronensäure/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l;
(Begrenzung durch NH_4^+ und Citronensäure)

Medium ab Zeitpunkt 0: 1,8 g Glucose/l; 1 g KNO_3/l; 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$/l
(Begrenzung durch Glucose)

Zum Zeitpunkt 0 wurden der Kultur 1,8 g Glucose/l und 1 g KNO_3/l beigemischt

Die gestrichelte Linie entspricht der Auswaschrate vom 0,196 Std^{-1}.

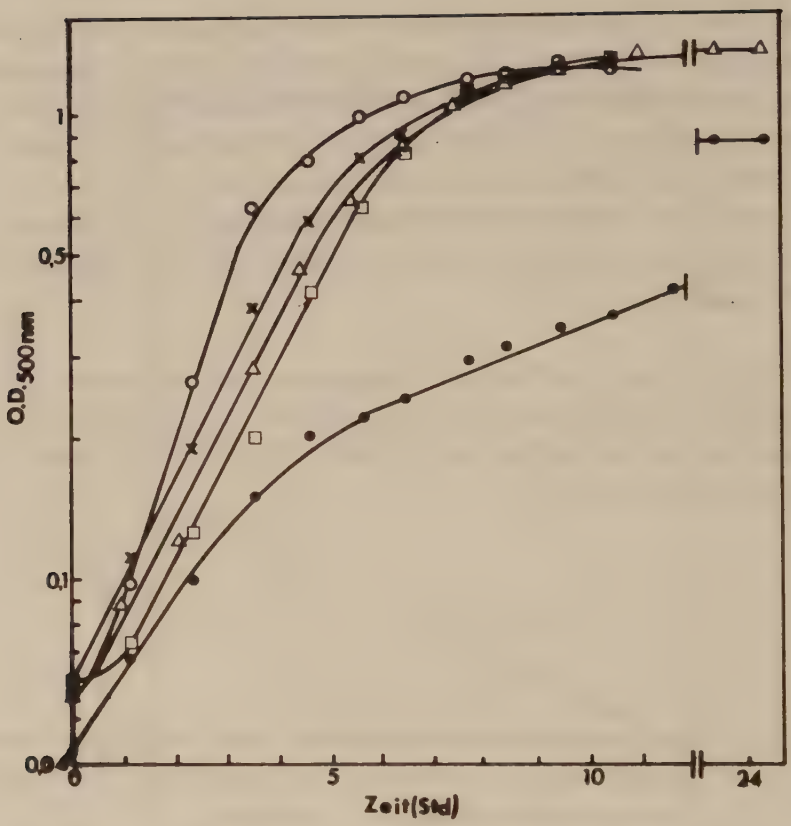


Abb. 15 Anaerobes Wachstum von E. aerogenes auf Citrat, Glucose und Nitrat

x Wachstum auf Glucose
o Wachstum auf Glucose + Nitrat
△ Wachstum auf Glucose + Citrat + Nitrat
□ Wachstum auf Citrat
● Wachstum auf Citrat + Nitrat

Anzuchtbedingungen wie im methodischen Teil beschrieben.

Tab. 1 Anaerobes Wachstum von E. aerogenes auf Citrat, Glucose und Nitrat; Kalkulationen zu Abb. 15

Kulturbedingung	mM Glucose eingesetzt	mM Glucose verbraucht	mM Citrat eingesetzt	mM Citrat verbraucht	O.D.[1]	"Effektivität"[2]	$\mu \left[h^{-1}\right]$
Glucose	40	40	-	-	1,2	3	0,5
Glucose + NO_3^-	40	16	-	-	1,2	7,5	0,76
Glucose + Citrat + NO_3^-	40	22	34	5	1,35	5	0,5
Citrat	-	-	34	34	1,25	3,7	0,5
Citrat + NO_3^-	-	-	34	11	0,85	7,7	0,1

[1] $O.D._{500\ nm}$ nach Wachstumsstop

[2] Die "Wachstumseffektivität" wurde berechnet nach: $\dfrac{\text{End-O.D.}_{500\ nm} \cdot 100}{\text{Substratverbrauch mM}}$

Eine andere auf Citrat plus Nitrat wachsende Kultur wurde bei einer $O.D._{500\ nm}$ von 0,32 abgeerntet und die Citrat-Lyase-Aktivität bestimmt. Ohne Acetylierung wurden 0,99 E/mg Protein gemessen, nach Acetanhydrid-Behandlung 0,7 E/mg Protein. Die Citrat-Lyase lag also in normaler Aktivität und im voll aktiven Zustand vor. Die Wachstumshemmung kann somit nicht dadurch erklärt werden, daß die Citrat-Lyase inaktiv war. Es wäre jedoch möglich, daß auf der Enzymmodifikationsebene ein "futile cycle" entstand: das aktivierende Enzym war unter der Bedingung "anaerobes Wachstum auf Citrat" angeschaltet und arbeitete ständig gegen den Nitrat-abhängigen Inaktivierungsprozeß an. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß durch diesen Prozeß der Zelle ein entscheidender Energieverlust zugefügt werden konnte. Die grobe Kalkulation, die in Tabelle 1 durchgeführt wurde, bestätigt das: die Wachstumseffektivität auf Citrat plus Nitrat war doppelt so hoch wie auf Citrat (Bei Glucose-Wachstum erhöhte sich die Effektivität bei diesem Versuch um den Faktor 2,5).

Wahrscheinlicher wäre, daß der Acetyldonor (nach SCHMELLENKAMP und EGGERER (1974) Acetyladenylat), der unter Umständen neben der Citrat-Lyase Acetylierungsreaktion noch für andere Zwecke in der Zelle benötigt wird, durch den "futile cycle" aufgebraucht wurde und die Zellen so unter Mangelbedingungen kamen. Eine ähnliche Hemmung hätte in dem Wachstumsversuch auf Glucose + Citrat + Nitrat eintreten müssen. Abb. 15 und Tab. 1 zeigen jedoch, daß Rate und Effektivität des Wachstums nur schwach vermindert waren. Die einfachste Erklärung für das Ausbleiben der Wachstumshemmung unter diesen Bedingungen wäre, daß aus der Glucose ständig der Acetyldonor regeneriert werden konnte (Eine ganz ähnliche Situation ergibt sich bei E. coli; s. Diskussion).

Zusammenfassend kann man sagen, daß E. aerogenes auf Citrat plus Nitrat unter starke Wachstumshemmung geriet. Als Grund hierfür wird ein unter diesen Bedingungen mangelhaftes Zusammenspiel auf der Regulationsebene

der Citrat-Lyase vermutet.

2.1.2.13. Umschalten von anaerobem Citrat- auf aerobes Citrat-Wachstum unter Sulfat-Mangel-Bedingungen

Im Abschnitt 2.1.2.4 wurde bereits ein Umschaltversuch geschildert, in dessen Verlauf die kontinuierliche Kultur unter Sulfat-Mangel stand. Bei diesem Experiment (Citrat anaerob ⟶ Glucose aerob; Sulfat-Begrenzung) wurde für die Citrat-Lyase die gleiche Inaktivierungsrate beobachtet wie im Vergleichsversuch mit NH_4^+-Limitierung der kontinuierlichen Kultur (Abb. 5). Ein ähnliches Experiment ist in Abb. 16 dargestellt. Hier wurde von anaerobem auf aerobes Citrat-Wachstum umgeschaltet. Die Kultur wurde dabei unter SO_4^--Mangel gehalten (Der Vergleichsversuch findet sich in Abb. 4. Citrat anaerob ⟶ Citrat aerob; NH_4^+-Begrenzung). Das Ergebnis überrascht: die Citrat-Lyase wurde nicht inaktiviert. Außerdem blieb auch im Aeroben ein sehr hoher Citrat-Lyase level bestehen. Vielleicht ist das ein Hinweis darauf, daß Inaktivierung und Repression gleichsinnig reguliert werden (s. Diskussion).

In der Literatur sind mehrere Arbeiten zu finden, in denen Wachstumsversuche unter Sulfat-Mangelbedingungen beschrieben wurden: E. aerogenes von STOUTHAMER und BETTENHAUSEN (1975), E. coli von POOLE und HADDOCK (1974, 1975), Torulopsis utilis von HADDOCK und GARLAND (1971), Candida utilis von DOWNIE und GARLAND (1973). Übereinstimmend berichten die Autoren, daß unter Sulfatmangel die "phosphorylation site I" (cytochromunabhängiger Elektronenfluß von NADH zu Cytochrom b) verloren geht. Offensichtlich kann das beteiligte non-haem-iron Protein nicht mehr gebildet werden. Eisenmangel führt zu ähnlichen Symptomen: RAINNIE und BRAGG (1973) mit E. coli; COBLEY et al. (1975) mit Candida utilis. Sulfatmangel führt also zu einer erheblichen Störung des Elektronentransportapparates. Akzeptiert man die Hypothese, daß die Inaktivierung der Citrat-Lyase gekoppelt ist an Elektronentransport und/oder Phosphorylierungs-

vorgänge, so wird verständlich, daß in dem hier geschilderten Versuch (Abb. 16) keine oder nur eine schwache Inaktivierungsrate gefunden wurde. Fraglich bleibt dann jedoch, warum in dem Versuch Abb. 8 (Citrat anaerob ⟶ Glucose aerob; Sulfat-Begrenzung) normal inaktiviert wurde. Wahrscheinlich war zur Verhinderung der Inaktivierung die gleichgerichtete Aktion zweier Faktoren notwendig: erstens der auch im Aeroben leicht induktive Effekt des Citrats auf die Bildung und den Aktivitätszustand der Citrat-Lyase (s. S.11) und zweitens die Modifizierung der Elektronentransportkette durch Sulfat-Mangel.

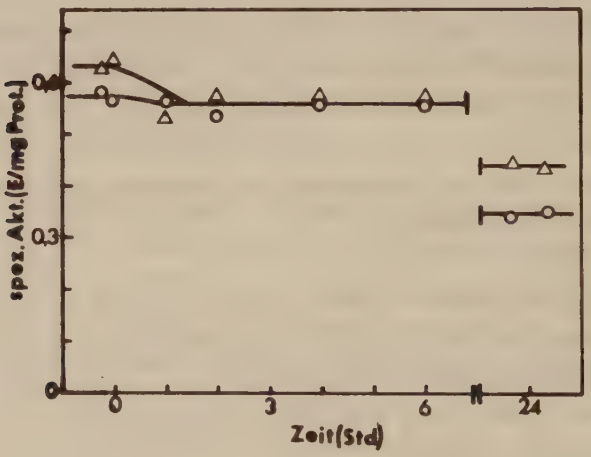


Abb. 16 Verhalten der Citrat-Lyase beim Übergang vom anaeroben auf aerobes Citrat-Wachstum bei Sulfatbegrenzung der kontinuierlichen Kultur (E. aerogenes)

△ aktive Citrat-Lyase; o aktive + inaktive Citrat-Lyase

Medium: 8,1 g Citronensäure/l; 0,4 g $(NH_4)_2SO_4$/l; 8 mg Na_2SO_4 . 10 H_2O/l
(Begrenzung durch SO_4^{2-})

Zum Zeitpunkt 0 wurde von anaerob nach aerob umgeschaltet.

2.1.3. Einfluß der C- und Energiequelle auf die Citrat-Lyase-Inaktivierungsaktivität

Die Durchführung dieser und der folgenden Versuche war nicht mehr in der kontinuierlichen Kultur möglich. Es wurde deswegen ein batch-Verfahren ausgearbeitet und verwendet, wie es im methodischen Teil beschrieben ist.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß ohne C- und Energiequelle (bzw. Donator von Reduktionsäquivalenten) nur eine schwache Inaktivierung der Citrat-Lyase erreicht wurde. Glycerin und Lactat führten im Vergleich zu Glucose nur zu 40 % schwächeren Raten. Es stellte sich die Frage, in wie weit der starke Effekt von Glucose Ausdruck der katabolischen Repression war, die von diesem Zucker ausgeübt wird (MAGASINIK, 1961). Hohe extrazelluläre Gaben c-AMP überwinden die katabolische Repression (PASTAN und PERLMAN, 1970 (Übersichtsartikel); HEMPFLING und MAINZER, 1975). Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, wurde die Inaktivierungsaktivität durch c-AMP-Gabe stark gemindert. Damit stände der Aktivitätszustand der Citrat-Lyase im Aeroben zum Teil unter Kontrolle der katabolischen Repression.

Extrazelluläre Gabe von hohen Konzentrationen c-AMP ist, obwohl regelmäßig angewandt, nicht unumstritten. Es ist erstaunlich, daß die katabolische Repression erst bei 5 mM extrazellulärer c-AMP-Konzentration überwunden wird, wo doch die intrazelluläre Konzentration um drei Zehnerpotenzen niedriger liegt (HAGGERTY und SCHLEIF, 1975). Wahrscheinlich haben die hohen extrazellulären Konzentrationen unkontrollierbare Nebeneffekte (WAYNE und ROSEN, 1974).

Die Wirkung der katabolischen Repression und des c-AMP auf die Inaktivierung der Citrat-Lyase wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Tab. 2 Einfluß der C- und Energiequelle auf die Citrat-Lyase-Inaktivierungsaktivität in E. aerogenes

Bedingungen im Inaktivierungsansatz	% Hemmung der Inaktivierung
vollständiger Ansatz	0
+ 3 mM c-AMP	50
+ 6 mM c-AMP	64
Glycerin statt Glucose	36
Lactat statt Glucose	41
ohne Glucose	79
0,1 M KP-Puffer, pH 7	86

Die Zellen waren 12 Stunden anaerob im Citrat-Medium gewachsen und hatten die frühe stationäre Phase erreicht. Anschließend wurde für 1 Stunde aerob im Glucose-Medium (vollständiger Ansatz) oder, wie jeweils angegeben, mit den veränderten Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Citrat-Lyase-Aktivitäten vor und nach Acetylierung bestimmt. Die im vollständigen Ansatz erzielte Inaktivierung wurde als 0 % Hemmung definiert. Das Ausbleiben einer Inaktivierung gilt als 100 % Hemmung.

Vollständige Versuchsbeschreibung im methodischen Teil.

2.1.4. Versuche mit Protein-, RNS- und DNS-Synthesehemmern

Die Dynamik der Inaktivierung der Citrat-Lyase beim Umschalten vom anaeroben Citrat- auf aerobes Glucose-Wachstum ließ auf Grund der extrem kurzen lag-Phase (Abb. 5) vermuten, daß keine Proteinsynthese notwendig war, um den Prozeß in Gang zu bringen. Allerdings ist für E. coli bekannt, daß unter optimalen Bedingungen die ß-Galaktosidase schon nach wenigen Minuten voll induziert ist (KOCH, 1971). Deswegen wurde versucht, ob die Inaktivierung durch Zugabe von Protein-, RNS- oder DNS-Synthesehemmern verhindert werden konnte. Tab. 3 zeigt, daß dies nur in relativ geringem Maße gelang. Chloramphenicol hemmt in spezifischer Weise die Protein-

synthese in Bakterien, in dem es an die 50 S Untereinheiten der Ribosomen bindet. Bereits eine Konzentration von 8 µM verhindert das Wachstum der Enterobakterien (HAHN, 1967). Die Wirkung setzt praktisch ohne Zeitverlust ein. Es ist bekannt, daß Chloramphenicol in höheren Konzentrationen (1 mM oder höher) als Nebeneffekt Atmungsaktivitäten hemmen kann (HAHN, 1967). In E. coli wirkt Chloramphenicol als schwacher Entkoppler (SAIER et al., 1975) oder in Konzentrationen höher als 0,15 mM als Hemmer der NADH-Oxidase (HADDOCK und SCHAIRER, 1973).

Tab. 3 Inaktivierung der Citrat-Lyase in E. aerogenes unter dem Einfluß von Protein-, RNS- und DNS-Synthesehemmern

Bedingungen im Inaktivierungsansatz	Konz.	% Hemmung der Inaktivierung
vollständiger Ansatz	-	0
+ Chloramphenicol	1 mM	48
"	0,1 mM	55
"	0,01 mM	57
+ Rifampycin	10 µg/ml	34
+ Mitomycin c	0,5 µg/ml	24

Legende wie Tab. 2.

Das aktivierende und das inaktivierende System der Citrat-Lyase in R. gelatinosa stellte sich als äußerst sensibel gegenüber offensichtlich unspezifischen Nebenwirkungen des Chloramphenicols heraus. Erst bei Konzentrationen kleiner als 10^{-2} mM ließ dieser unspezifische Hemmeffekt nach (GIFFHORN, 1974). Tabelle 3 zeigt, daß Chloramphenicol die Inaktivierungsaktivität in E. aerogenes um ungefähr 50 % hemmte. Die Konzentrationsunabhängigkeit dieses Effektes ließ vermuten, daß es sich hierbei nicht um eine unspezifische Nebenwirkung handelte. Auch die kleinste eingesetzte Kon-

zentration von 10 µM reicht noch zur Hemmung der Proteinsynthese aus.

Rifampycin hemmt die DNS-abhängige RNS-Polymerase (WEHRLI und STAEHLIN, 1975). In der eingesetzten hohen Konzentration wirkt es auch in intakten Enterobakterien (WEHRLI et al., 1968). Die Wirkung auf die Inaktivierung der Citrat-Lyase war leicht hemmend (Tab. 3).

Mitomycin c vernetzt die DNS und verhindert so ihre Replikation. Die Translation wird nur mäßig gestört (SZYBALSKI und IYER, 1967). Die Inaktivierung der Citrat-Lyase wurde schwach gehemmt (Tab. 3).

Zusammenfassend kann man sagen, daß anaerob auf Citrat wachsende E. aerogenes Zellen alle Proteine besitzen, die für die Inaktivierung der Citrat-Lyase notwendig sind.

2.1.5. Citrat-Lyase-Inaktivierung unter dem Einfluß von Entkopplern und Hemmern der Atmungskette

Einige der geschilderten Ergebnisse deuteten darauf hin, daß eine Kopplung zwischen der Inaktivierung der Citrat-Lyase und der Atmungskette besteht. Es wurde nun geprüft, inwieweit Hemmer und Entkoppler der Respiration Einfluß auf diesen Inaktivierungsprozeß hatten. In Tabelle 4 sind die Atmungsgifte aufgelistet, die in diesem Experiment eingesetzt wurden. Drei Kriterien wurden zur Auswahl herangezogen:

a) die Wirksamkeit auf gram-negative Bakterien,

b) Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus sollten in der Literatur beschrieben sein,

c) es sollte ein weites Spektrum erfaßt werden, d. h. möglichst jede Stelle der Elektronentransportkette sollte durch einen der Effektoren getroffen werden.

Tab. 4 Beeinflußung der in vivo-Inaktivierung der Citrat-Lyase von E. aerogenes durch Hemmer und Entkoppler der Elektronentransportkette

Bedingungen im Inaktivierungsansatz	Konz. mM	% Hemmung der Inaktivierung	Beschleunigung der Inaktivierung um den Faktor
vollständiger Ansatz	-	0	
+ KCN	0,5	65	
+ HQNO	0,04	23	
+ DCCD[1]	0,1	65	
+ Amytal	2	9	
+ DNP	2	89	
"	0,5	32	
+ PCP	1	97	
+ CCCP[1]	0,01	48	
"	0,002	18	
+ TCS	0,02	45	
+ AsO_4^{3-}	10	95	
+ PCMB[2]	0,1		3,7[2]
+ NEM[2]	1		3,2[2]
+ Valinomycin[1]	100 µg/ml	34	

Legende wie in Tab. 2 auf Seite 42.

[1] DCCD und CCCP wurden in Äthanol, Valinomycin in Eisessig gelöst und im Verhältnis 1 : 1 000 in den Ansatz gegeben.

[2] Die SH-Reagenzien brachten eine Beschleunigung der Inaktivierung.

Nach Inkubation mit diesen Stoffen war keine Acetylierung mehr möglich, da die SH-Gruppen des Enzyms blockiert waren. Hier wurde der vergleichbare Aktivitätswert des vollständigen Ansatzes zur Berechnung herangezogen.

Eine acetyliert vorliegende Citrat-Lyase-Lösung wurde durch einstündige Inkubation (30° C; 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7) mit 0,1 mM PCMB um 95 % inaktiviert. Inkubation mit 1 mM NEM brachte keinen Aktivitätsverlust. Der hier wiedergegebene in vivo-Inaktivierungsversuch mit PCMB als Effektor ist somit nicht aussagekräftig, da zwischen Desacetylierung und unspezifischer Inaktivierung nicht unterschieden werden kann.

Im folgenden werden die Stoffe kurz charakterisiert. KCN, HQNO, DCCD und Amytal wurden als Hemmer des Elektronentransportes eingesetzt. Diese Stoffe blocken den Elektronenfluß und verhindern damit Atmung und die davon abhängige Energiegewinnung. KCN hemmt die Cytochrom-Oxidase (Komplex IV), HQNO den Elektronenfluß vom Flavoprotein zum Cytochrom b oder vom Cytochrom b zum Cytochrom c (Komplex III), Amytal - ein Barbiturat - den Elektronenübergang vom NADH zum Flavoprotein (Komplex I) (HEINEN, 1971). DCCD hemmt das energieübertragende System von der Membran zur ATPase (FILLINGAME, 1975).

Die Entkoppler bewirken den Zusammenbruch des elektrochemischen Potentials an der Membran (MITCHELL, 1961). Im Mitochondrien-System steigern diese Gifte den Elektronenfluß und damit die Respirationsrate, da die unter Normalbedingungen enge Kopplung an die Energiegewinnung nicht mehr gegeben ist (LARDY und WELLMANN, 1952).

In Bakterien (E. coli) ist diese Respirationskontrolle viel schwächer ausgeprägt ; im zellfreien System ist sie nicht mehr vorhanden(LAVORI, AVIDOR und GROSSOWICZ, 1967). Entsprechend anders ist die Wirkung der Entkoppler. Im zellfreien System unterdrücken sie die ATP-Bildung, lassen die Respirationsrate aber unbeeinflußt. Auf ganze Zellen ist die Wirkung je nach Bedingungen unterschiedlich. CCCP beispielsweise hemmt die Succinat-Oxidation, stimuliert aber schwach die Veratmung von Glucose (CAVARI et al., 1967). Auch DNP wirkt hemmend auf die Atmungsaktivität von E. coli (HINO und MAEDO, 1966).

Die Wirkung der "klassischen" Entkoppler (z. B. die hier eingesetzten Verbindungen DNP, PCP, CCCP und TCS) wurde meist dadurch erklärt, daß diese Stoffe in der Membran Protonen-leitende Eigenschaften entwickeln und so zum Zusammenbruch des pH-Gradienten führen (MITCHELL und MOYLE, 1967). Tatsächlich wurde eine Korrelation zwischen Protonentransportierenden und -entkoppelnden Eigenschaften sowohl für Mitochon-

drien (CUMARRO und WEINER, 1975) als auch für modellhafte künstliche Membranen gezeigt (LIBERMAN et al., 1969; HOPFER, LEHNINGER und THOMPSON, 1968). Im Widerspruch zu diesen Arbeiten konnten TING, WILSON und CHANCE (1970) keine direkte Korrelation zwischen der Herabsetzung des elektrischen Widerstandes einer künstlichen "bilayer" Lipidmembran und der Stimulierung (Entkopplung) der Mitochondrienatmung durch Entkoppler feststellen. Dieselben Autoren (WILSON et al., 1971) kamen zu dem Schluß, daß die Entkoppler nicht als Protonen-carrier, sondern eher in der nichtwässrigen Region der Membran als Säure-Base-Katalysatoren wirken.

Einige andere Arbeiten zeigten, daß die Entkoppler an spezifische Proteine in der Membran binden und über eine Hemmung oder Inaktivierung dieser hypothetischen "Kopplungsproteine" zur Entkopplung führen (WEINBACH und GARBUS, 1969). Der Zusammenbruch des elektrochemischen Potentials wäre dann nur eine Folge dieser Primärprozesse. KABACK et al. (1974) zeigten, daß CCCP - einer der am häufigsten eingesetzten Entkoppler - in der Membran überraschenderweise wie ein SH-Reagenz reagiert: seine Wirkung ist hemmbar und aufhebbar durch Thiolverbindungen; weiterhin senkt es die Reaktionsbereitschaft der Membran gegenüber dem SH-Reagenz NEM. Jedoch ist die Wirkung des CCCP nicht direkt vergleichbar den klassischen SH-Reagenzien mit entkoppelnder Wirkung PCMB und NEM: CCCP führt im Kaback-System (KABACK, 1974) zum Ausfließen der transportierten Substanzen aus den Vesikeln, was von PCMB und NEM verhindert wird. Weiterhin hemmt CCCP im Unterschied zu PCMB und NEM nicht die membrangebundene D-Lactat-Oxidation.

DNP teilt nicht diese Eigenschaften des CCCP. In der Arbeit von HANSTEIN und HATEFI (1974) wird jedoch eine enge Beziehung zwischen der Primärwirkung von DNP und CCCP aufgezeigt. Die Autoren fanden, daß 2-Acido-4-Nitrophenol (ein DNP Analoges mit entkoppelnder Wirkung, das, wenn photoaktiviert, kovalente Bindungen eingeht) an ein bestimmtes, nicht wei-

ter charakterisiertes Membran-Protein bindet. Dort ist es kompetitiv verdrängbar durch DNP, PCP und CCCP, nicht jedoch durch Arsenat.

Arsenat wirkt entkoppelnd sowohl auf die Substratkettenphosphorylierung als auch auf die Atmungskette (CRANE und LIPMANN, 1953). Die Folge ist ein massiver Verlust an gebundener Energie in der Zelle. 10 mM Arsenat (im phosphatfreien Puffer) senkt den ATP-Spiegel in der E. coli-Zelle auf weniger als 5 % des normalen Spiegels (KLEIN und BOYER, 1972). DNP, CCCP und TCS berühren als "klassische" Entkoppler nicht die Substratkettenphosphorylierung und senken den ATP-Spiegel in der Zelle nur unwesentlich, solange Glucose zur Verfügung steht (SAIER et al., 1975; PAVLASOVA und HAROLD, 1969). Die Wirkung des Arsenats beruht auf seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Phosphat. Bereits die Anwesenheit kleiner Phosphatmengen kann die Arsenat-Wirkung aufheben (TER WELLE und SLATER, 1964). ERNSTER, LEE und JONDA (1967) untersuchten die Kompetitivität zwischen Phosphat und Arsenat in der mitochondriellen Atmungskette näher und fanden zwei Arsenat sensible Stellen. Die eine entkoppelnde Wirkung war leicht durch Phosphat hemmbar (K_i = 0,076 mM), um die andere Stelle konkurrierten Phosphat und Arsenat etwa gleichberechtigt (K_i = 1,2; K_m = 0,83; beide Werte für das Phosphat).

Zu einer anderen Klasse von Entkopplern gehören die schon erwähnten SH-Reagenzien PCMB und NEM. Unzweifelhaft bewirken sie eine effektive Entkopplung (PAVLASOVA und HAROLD, 1969; SAIER et al., 1975; BISSCHOP, DODDEMA und KONINGS, 1975). Die Interpretation der Ergebnisse wird jedoch dadurch erschwert, daß diese Substanzen unspezifisch alle erreichbaren SH-Gruppen angreifen und so vielfältige Wirkung erzielen können (ROTHSTEIN, 1970).

Das Kaback-Transportsystem (KABACK, 1974) wird auf spezifische Weise durch NEM und PCMB gehemmt. Der Angriffspunkt liegt zwischen D-Lactat-Dehydrogenase und dem Cytochrom b_1 (KABACK, 1972).

Gut beschrieben ist die Wirkung des Valinomycin. Es katalysiert als Ionophor hochspezifisch den K^+-Fluß durch die Membran und führt damit zum Zusammenbruch des elektrischen Membranpotentials sowie zu entkoppeltem Elektronenfluß (HAROLD, 1970; Übersichtsartikel). Seine Wirkung auf intakte Enterobakterien ist nur schwach (PAVLASOVA und HAROLD, 1969). Hier wurde Valinomycin in einer Konzentration eingesetzt, die für die Wachstumshemmung von E. coli ausreicht (SHEMYAKIN et al., 1965).

Es wird deutlich, daß die Hemmstoffe und Entkoppler an den verschiedensten Stellen und auf kaum vergleichbare Weise in dem außerordentlich komplexen System der Elektronentransportkette ansetzen. So wäre es verfehlt, die Wirkung der Entkoppler stets auf die Erhöhung der Protonenleitfähigkeit in der Membran zurückzuführen. Die Wechselwirkungen zwischen Entkopplern und Membran bzw. ihrer Komponenten ist weitaus komplexer und nur zum geringen Teil verstanden. Unter diesen Einschränkungen und Voraussetzungen müssen die Ergebnisse in Tab. 4 interpretiert werden. Nach ihrer Wirksamkeit auf die in vivo-Inaktivierung der Citrat-Lyase geordnet, lassen sich vier Gruppen unterscheiden:

a) Keinen oder nur wenig Einfluß hatten Amytal, HQNO und Valinomycin.

b) Eine Halbierung der Inaktivierungsaktivität brachten die Hemmer KCN und DCCD sowie die Entkoppler CCCP und TCS.

c) Eine annähernd vollständige Verhinderung der Inaktivierung wurde durch die Entkoppler PCP, Arsenat und DNP erreicht. Die notwendige DNP-Konzentration von 2 mM lag relativ hoch. Auf andere Systeme wirken in intakten Enterobakterien schon 0,15 mM DNP (OHKI, 1975) oder 0,5 mM (SAIER et al., 1975). In den meisten Arbeiten wird jedoch 2 mM DNP eingesetzt (HEINEN, 1971). HANSTEIN und HATEFI (1974) weisen ausdrücklich darauf hin, daß Entkoppler-Konzentration und -Wirkung nur dann verglichen werden können, wenn jeweils der gleiche Effekt gemessen wurde.

Ein weiterer spezifischer Effekt des DNP und PCP ist die hemmende Wirkung, die diese Substanzen auf Kinasen und Dehydrogenasen ausüben (STOCKDALE und SELWYN, 1971). Die Phenole sollen als "Parasit-Substrate" in Wechselwirkung mit den entsprechenden Enzymen stehen (DALL-LARSEN et al., 1976).

Unspezifische Nebenwirkungen des DNP sind erst ab Konzentration höher als 3 mM bekannt geworden (KOVAC und KUZELA, 1966).

Bemerkenswert ist, daß Arsenat (10 mM) seine Wirkung trotz Anwesenheit von 37 mM Phosphat erzielte. Geringe Mengen Phosphat hemmen normalerweise die Wirkung des Arsenats. Wie oben ausgeführt, gibt es jedoch (in der mitochondriellen Atmungskette) eine durch Arsenat entkoppelbare Stelle, die weitgehend unsensibel ist gegenüber der Gegenwirkung des Phosphats. Ganz ähnlich wirkt Arsenat in dem von PARNES und BOOS (1973) beschriebenen Transportsystem für ß-Methylgalaktosid in E. coli. Es handelt sich wiederum um ein Kaback-Transportsystem (KABACK, 1974), das von der energetisierten Membran getrieben wird. Arsenat hemmt in dem verwendeten ATP-unabhängigen und ATPase-freien System den Transport auch bei Anwesenheit von Phosphat.

d) Die SH-Reagenzien NEM und PCMB brachten eine über dreifache Beschleunigung der Inaktivierung. Auf Grund der Unspezifität dieser Wirkstoffe ist dieses Ergebnis jedoch mit Vorsicht zu betrachten.

Es wird deutlich, daß die Gifte der Elektronentransportkette eine starke Hemmung auch in Bezug auf die Inaktivierung der Citrat-Lyase entfalteten. Als besonders aktiv zeigten sich dabei die Entkoppler DNP, PCP und Arsenat. Zwei weitere als sehr wirksam beschriebene Entkoppler (CCCP und TCS) waren in diesem System weit weniger aktiv. Wahrscheinlich wirken PCP, DNP und Arsenat direkt auf die "Entkopplungskomponente" zwischen Elektronentransport und Citrat-Lyase-Inaktivierung. Nicht direkt verant-

wortlich zu sein scheint der Zusammenbruch des elektrochemischen Potentials, da sonst TCS und CCCP gleiche Wirksamkeit hätten entfalten müssen. Eine ganz ähnliche Situation ergibt sich im Kaback-System (KABACK, 1974; SPROTT et al., 1975). Auch hier wirken die Entkoppler unterschiedlich, obwohl doch ihre Wirkung auf das Membranpotential gleich sein sollte. Hieraus ergeben sich ernste Schwierigkeiten für die Interpretation der treibenden Kraft für diesen energieaufwendigen Transport- und Konzentrations-Prozeß (KABACK, 1974).

Bei Anwendung von Entkopplern auf ganze Zellen ist bei der Interpretation der Wirkung Vorsicht geboten. Zwar greifen diese Stoffe meist sehr spezifisch die Membran an, jedoch können die resultierenden sekundären Effekte auf die pool-Größen in der Zelle von großer Bedeutung sein. Die beobachtete Wirkung könnte durch die Änderung der Konzentration einer dieser Metabolite hervorgerufen sein. Von besonderem Interesse muß bei dieser Betrachtung der ATP-pool sein. Die Tatsache, daß gerade Arsenat mit hoher Effizienz die Inaktivierung der Citrat-Lyase verhinderte, könnte ein Hinweis darauf sein, daß für den Inaktivierungsprozeß ATP notwendig ist. Dies ist jedoch aus mehreren Gründen unwahrscheinlich:

a) Es ist nicht einzusehen, daß die exergonische Verseifungsreaktion des Acetyl-Sulfhydrylesters einer Energetisierung bedarf.

b) ATP als positiver Effektor für die Inaktivierungsreaktion wäre nicht sinnvoll.

c) Entkoppler können zu einer Verarmung der Zelle an ATP führen. Nach Zusammenbruch des Membranpotentials kehrt sich die membrangebundene ATPase-Aktivität um in Richtung ATP-Hydrolyse. Wie oben ausgeführt, kommt es zu einer Senkung des ATP-pools aber nur dann, wenn auch die Glykolyse unterbunden ist.

d) Arsenat wirkte auch in Gegenwart des Phosphats. Wie oben gesagt, ist unter diesen Bedingungen die hemmende Wirkung des Arsenats auf die

Phosphorylierungskapazität der Zelle weitgehend aufgehoben. Ein Beispiel: Der ATP-abhängige Transport von Methionin in E. coli-Zellen kann durch 10 mM Arsenat gehemmt werden. Gibt man zusätzlich 10 mM Phosphat, so wird diese Hemmung weitgehend aufgehoben (KADNER und WINKLER, 1975).

Eine weitere Interpretationsschwierigkeit, die sich bei diesem Versuch (Tab. 4) ergibt, ist die Frage, inwieweit die Membrankomponenten, die die Angriffsorte der verwendeten Atmungsgifte darstellen, überhaupt unter den anaeroben Bedingungen schon induziert waren (In Kapitel 2.1.4. wurde gezeigt, daß alle zur Inaktivierung notwendigen Komponenten vorhanden waren und nicht erst durch die aeroben Verhältnisse induziert wurden).

Arbeiten, die sich mit der "Konstitutivität" der Atmungskette bzw. ihrer Komponenten beschäftigt, sind in einem Übersichtsartikel von HARRISON (1973) zusammengefaßt. Obwohl sich das Elektronentransportsystem der Enterobakterien sehr variabel an die unterschiedlichen Bedingungen anpassen kann, wird deutlich, daß die Funktionsfähigkeit der Atmungskette auch unter Anaerobiose erhalten bleibt.

2.1.6. In vitro-Inaktivierung der Citrat-Lyase aus E. aerogenes

Wie Abb. 17 a und b zeigen, war die Citrat-Lyase von E. aerogenes im Rohextrakt relativ stabil. Es waren viele Stunden notwendig, um eine 50 %ige Desacetylierung zu ereichen. Es wäre nicht gerechtfertigt, hinter diesen kleinen Desacetylierungsraten den physiologischen Inaktivierungsmechanismus zu vermuten. Der Interpretation dieser Kurven kommt somit nur wenig Aussagekraft zu. Es fällt auf, daß diese desacetylierende Aktivität sowohl den anaerob auf Citrat gewachsenen als auch den aeroben Citrat-, anaeroben und aeroben Glucose-Zellen eigen war. Weiterhin ist ablesbar, daß auch gewaschene Membranen diese schwache Citrat-Lyase-desacetylierende Aktivität hatten.

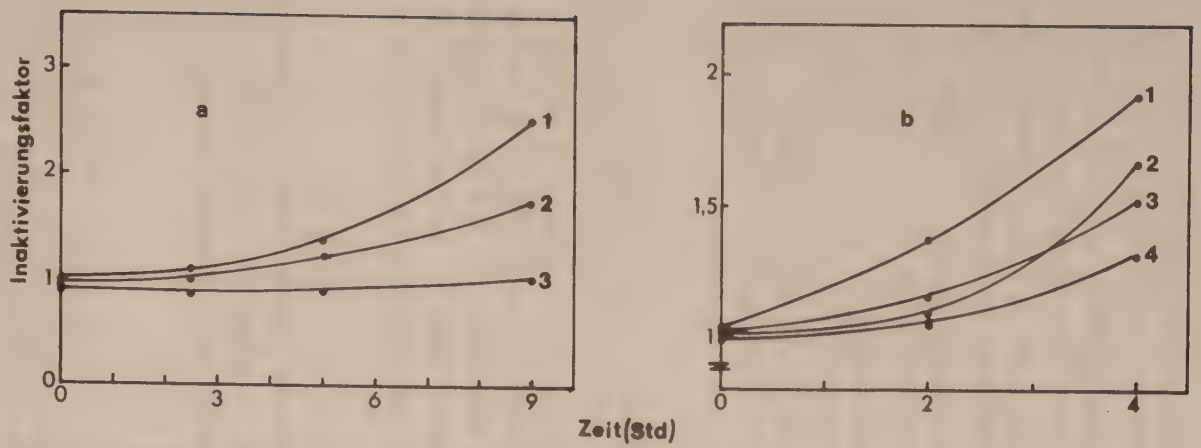


Abb. 17 In vitro-Inaktivierung der Citrat-Lyase aus E. aerogenes

Die Tests wurden durchgeführt wie im methodischen Teil beschrieben. Die in Abb. a verwendeten Zellen stammten aus einer shift-Phase (Periode des Umstellens vom anaeroben Citrat- auf aerobes Glucose-Wachstum in der kontinuierlichen Kultur; Phase starker in vivo-Inaktivierung). Die Zellen für den Versuch, der in Abb. b dargestellt ist, wurden aus den frühen stationären Phasen geerntet. Zellaufschluß jeweils durch Beschallen. Alle Ansätze (außer Abb. b "anaerob Citrat") waren mit Citrat-Lyase (Boehringer) versetzt.

a 1: Rohextrakt
a 2: Membranen, 1x gewaschen
a 3: Rohextrakt bzw. Membranen gekocht

b 1: Rohextrakt aus aeroben Citrat-Zellen
b 2: Rohextrakt aus aeroben Glucose-Zellen
b 3: Rohextrakt aus anaeroben Glucose-Zellen
b 4: Rohextrakt aus anaeroben Citrat-Zellen

Der Inaktivierungsfaktor (Ordinate) ist die Aktivität der Citrat-Lyase nach Acetylierung geteilt durch die Aktivität, die ohne Acetanhydridbehandlung erreicht wurde.

In ähnlichen Versuchen wurden dialysierte Rohextrakte, an Sephadex G 25 gereinigte sowie an DEAE-Cellulose fraktionierte Extrakte auf ihre Inaktivierungsraten getestet. In einem weiteren Versuch wurde die gesamte Aufarbeitung von Zellen aus einer shift-Phase (Phase des Übergangs zwischen anaerobem Citrat- und aerobem Glucose-Wachstum in der kontinuierlichen Kultur) bis zum membranhaltigen Rohextrakt ohne Abkühlung durchgeführt, um auf Kältelabilität zu prüfen.(Viele Regulationsenzyme sind kältelabil; PRUSINER, DAVIS und STADTMAN, 1976). Eine andere Probe von shift-Phase-Zellen wurde einem Lysozym-Aufschluß unter strikt anaeroben Bedingungen unterworfen, um eine eventuelle Denaturierung des inaktivierenden Enzyms im zellfreien System durch Sauerstoff zu verhindern. In keinem Fall konnte innerhalb einer Stunde eine deutliche Inaktivierung gemessen werde.

Ganz anders verhält sich die Citrat-Lyase von R. gelatinosa, die nach dem Zellaufschluß schnell inaktiviert, d. h. desacetyliert wird (GIFFHORN und GOTTSCHALK, 1975). Hier wird die Inaktivierung durch ein Citrat-Lyase-desacetylierendes = inaktivierendes Enzym bewirkt. Durch Glutamatzugabe kann dieses modifizierende Enzym gehemmt werden. Dies ist physiologisch sinnvoll, da die Citrat-Lyase-Reaktion Metabolite aus dem Glutamat-Syntheseweg abzieht. Glutamatmangel signalisiert der Zelle also, daß Citrat-Lyase-Aktivität schädlich ist.

In Umkehrung dieser negativen Kontrolle (Glutamat hemmt die Aktivität des inaktivierenden Enzyms) könnte bei E. aerogenes eine positive Regulation vorliegen. Das hieße, daß das inaktivierende Enzym einen Metaboliten als Aktivator benötigte.

In Tabelle 5 sind alle Substanzen aufgelistet, die im in vitro-Inaktivierungsansatz auf Effektor-Qualität getestet wurden. Im folgenden werden die Überlegungen geschildert, die zur Auswahl dieser Stoffe führten.

Tab. 5 In vitro-Inaktivierung der Citrat-Lyase; Substanzen, die auf Effektorwirkung geprüft wurden

I Metabolite	mM	II e^--Donatoren	mM	III e^--Acceptoren	mM	IV andere Effektoren	mM	V Metallionen	mM
Pyruvat	5	NADH	5	Methylviologen	2	ATP	5; 10	Mg^{++}	2; 5
Alanin	5	D-Lactat	5	Benzylviologen	2	ADP	5	Mn^{++}	2
CoA	5	L-Lactat	5	NADP	2; 10	ATP-Falle[3]		Co^{++}	2
Acetyl-CoA	5	Ascorbat + PMS[1]	10+0,1	NAD	2; 5; 10	c-AMP	3	Zn^{++}	2
Oxalacetat (+ 0,375 M Sacch.)	5	Succinat	5	FAD[4]	2	Phosphodiesterase		Ni^{++}	2
				FMN[5]	2	SAM[7]	0,5	Cu^{++}	2
Malat	5			Menadion[8]	2	KCN	5	Fe^{++}	2
Fumarat	5			Methylenblau	2	SO_4^{--}	5	Na^+	100
Succinat	5			PMS[1]	2	DTE[6]	0,5;1		
Succinyl-CoA	5			DCPIP[2]	2				
Asparagin	5			Cytochrom c	0,6				
Asparaginsäure	5			$K_3 Fe(CN)_6$	2				
Glucose	5			Luftsauerstoff	-				
Glutamat	5			H_2O_2[9]	200				

Legende siehe Seite 56.

Legende zu Tab. 5:

1 Phenazinmethosulfat
2 Dichlorphenolindophenol
3 Glucose (10 mM) + Hexokinase (0,1 mg/ml)
4 Flavinadenindinucleotid
5 Flavinmononucleotid
6 Dithioerythrit
7 S-Adenosylmethionin
8 Stammlösung 0,2 M in Aceton
9 Wegen der im Extrakt vorhandenen Katalase konnte diese hohe Konzentration eingesetzt werden

Die aufgelisteten Substanzen wurden einzeln und in sinnvollen Kombinationen auf ihre Wirkung im in vitro-Inaktivierungsansatz getestet. In keinem der Versuche konnte eine signifikante Beschleunigung der Inaktivierungsrate erreicht werden. Glutamat und KCN konnten die Inaktivierung nicht hemmen. Eine Begründung für die Auswahl der getesteten Substanzen findet sich im Text.

Für Gruppe III wurde ein membranhaltiger Rohextrakt anaerob auf Citrat gewachsener Zellen verwendet, für Gruppe V ein Rohextrakt von Zellen aus einer shift-Phase (Phase des Übergangs zwischen anaerobem Citrat- und aerobem Glucose-Wachstum in der kontinuierlichen Kultur), für Gruppe II Vesikelpräparationen von Zellen aus einer shift-Phase; für Gruppe I und IV wurden bevorzugt membranhaltige Rohextrakte (gewonnen durch Beschallen, french-press oder Lysozym-Aufschluß) von shift-Phasen-Zellen eingesetzt.

In vivo-Inaktivierung wurde stets bei Übergang zu aeroben Wachstumsbedingungen beobachtet. Unter den eintretenden oxidativen Bedingungen wird sehr schnell die Pyruvat-Formiat-Lyase inaktiviert (KNAPPE et al., 1969; 1974). Da gleichzeitig der Citronensäure-Cyclus noch nicht in Gang gekommen ist, da zunächst die Citrat-Synthase (Abb. 5 b) sowie die α-Ketoglutarat-Dehydrogenase (AMARASINGHAM und DAVIS, 1965) induziert werden müssen, kann sich an dieser Stelle ein Stau bilden. Die pools an Pyruvat (und/oder Alanin) und Acetyl-CoA (Pyruvat-Dehydrogenase ist in E. coli zum Teil konstitutiv und wird allosterisch reguliert; HANSEN und HENNING, 1966) würden ansteigen und könnten sinnvoll den Stoffwechselweg Citrat → Pyruvat, der durch die Citrat-Lyase-Reaktion eingeleitet wird, durch Aktivierung des Citrat-Lyase-inaktivierenden Enzyms abschalten. Ein Metabo-

lit-Rückstau könnte auch in den Cyclus hineinreichen über Oxalacetat, Malat, Fumarat, Succinat, Succinyl-CoA sowie - in Umkehrung des Glutamat-Effektes bei R. gelatinosa - Aspartat und Asparaginsäure.

Zu Oxalacetat als Effektor ist eine Randbemerkung notwendig: Oxalacetat wird als starker Hemmer der Citrat-Lyase beschrieben (BARMAN, Enzyme Handbook, 1969). Die Wirkung ist so zu verstehen, daß in Umkehrung der Lyase-Reaktion Citryl-S-Enzym gebildet wird, das spontan in das inaktive HS-Enzym hydrolisiert. Mechanistisch ist dies somit der gleiche Vorgang wie die Reaktionsinaktivierung. Da aber Reaktionsinaktivierung in der Zelle wie gezeigt (Kapitel 2.1.2.) nicht vorkommt, spielt auch der Inaktivierungsmechanismus durch Oxalacetat keine Rolle. Hohe osmotische Werte hemmen die Citrat-Lyase und folgerichtig auch die Reaktionsinaktivierung und die Inaktivierung durch Oxalacetat (BUCKEL et al., 1971). In dem Versuch zur Aktivierung des inaktivierenden Enzyms wurde deswegen Oxalacetat plus 375 mM Saccharose eingesetzt.

ATP und NAD wurden als Effektoren geprüft, da bei aerobem Wachstum höhere level vorliegen als bei anaeroben Bedingungen (HARRISON, MAC LENNAN und S. J. PIRT, 1969; Übersichtsartikel). Die ATP-Falle sollte ein cyclisches Regenerieren von energiereichen Acetylverbindungen verhindern, die zu einer enzymatischen Reacetylierung der Citrat-Lyase führen könnten (SCHMELLENKAMP und EGGERER, 1974).

S-Adenosylmethionin wird bei E. coli als Cofaktor bei der enzymkatalysierten Aktivierung der Pyruvat-Formiat-Lyase benötigt (KNAPPE et al., 1969; 1974), wobei die physiologische Rolle des SAM in dieser Reaktion völlig unklar bleibt.

c-AMP spielt eine Rolle bei einer ganzen Reihe von Regulationen in der E. coli-Zelle (PASTAN und PERLMAN, 1970). Phosphodiesterase spaltet c-AMP und andere Phosphodiester, die auch regulatorische Funktionen ha-

ben könnten.

Einige in der vorliegenden Arbeit geschilderten Versuche hatten nahegelegt, daß die Inaktivierung der Citrat-Lyase an das Ablaufen von Elektronentransportvorgängen gekoppelt sein könnte. Deswegen wurden mehrere reduzierte Verbindungen getestet, die Elektronen in dieses System einspeisen können.

Unter anderem Blickwinkel könnte man argumentieren, daß eine oder mehrere Komponenten des Elektronentransportapparates in oxidierter Form vorliegen müßten, da in vivo-Inaktivierung nur eintrat, wenn ein Elektronenendacceptor (O_2 oder NO_3^-) angeboten wurde. In vitro wurde versucht, diese Wirkung durch natürliche und unnatürliche Oxidationsmittel zu simulieren, wobei das gesamte natürliche Redoxspektrum von -0,44 bis +0,43 mV E'_o angeboten wurde.

In keinem Falle konnte eine signifikante Stimulierung der Inaktivierungsraten, wie sie in Abb. 1a und b gezeigt sind, erreicht werden. Glutamat und KCN konnten die Inaktivierung nicht hemmen.

2.1.6.1. Extraktion von shift-Phasen-Zellen

Die Idee bei diesem Versuch war, daß Zellen, die sich in einer Phase starker Citrat-Lyase-Inaktivierung befanden, einen Faktor enthalten, der extrahierbar ist und im in vitro-Ansatz ebenfalls zu hohen Inaktivierungsraten führt.

Im gleichen shift-Versuch wie er in Abb. 5 gezeigt ist, wurde zur Stunde 1 der Fermenter abgeerntet. 500 ml Kulturflüssigkeit wurden zu einem membranhaltigen Rohextrakt verarbeitet wie in Material und Methoden beschrieben.

4 x 500 ml wurden jeweils auf einem großen Cellulose-Filter (Ø 10 cm) abfiltriert und wie folgt abgestoppt und aufgearbeitet:

1. Filter mit den Zellen in kochendes Wasser, anschließend zentrifugiert (30 min 10 000 g), Überstand im Büchi-Rotationsverdampfer (60° C, Wasserstrahlpumpenvakuum) bis zur Trockene eingeengt.
2. Filter mit den Zellen in 50 ml 70 %igem Alkohol, zentrifugiert, Überstand anschließend gefriergetrocknet.
3. Filter mit den Zellen in 50 ml 0,1 M NH_4OH, 20 min beschallt, zentrifugiert, Überstand im Büchi bis zur Trockene eingeengt.
4. Filter mit den Zellen in 50 ml 0,1 M HCl, 20 min beschallt, zentrifugiert. Überstand im Büchi bis fast zur Trockene eingeengt, mit K_2HPO_4 neutralisiert und bis zur Trockene eingeengt.

Vom Zeitpunkt der Probennahme bis zum Abstoppen vergingen weniger als 3 Minuten.

Die gewonnene Trockensubstanzen wurden in jeweils 0,5 ml des membranhaltigen Rohextraktes aufgenommen. Da je 500 ml Kulturvolumen aufgearbeitet war, entsprach das einer Konzentrierung von 1 : 1 000. Da ungefähr eintausendstel des Kulturvolumens aus Zellen bestand, sollten so die Verhältnisse in der Zelle simuliert werden (Für E. coli gilt nach WINKLER und WILSON (1966) ein inneres Zellvolumen von 2,7 µl pro mg Zelltrockengewicht. Die hier verwendete Kultur enthielt 0,39 mg Zelltrockengewicht/ml und somit 2,7 . 0,39 = 1,05 µl inneres Zellvolumen pro ml Kultur).

Innerhalb einer Stunde konnte in allen vier Ansätzen keine Inaktivierung der Citrat-Lyase gemessen werden.

Zusammenfassend kann man sagen, daß es nicht gelang, in vitro die Aktivität eines Citrat-Lyase-inaktivierenden Enzyms zu zeigen.

2.1.7. Lokalisation der Citrat-Lyase in der Zelle

Einige der in der vorliegenden Arbeit geschilderten Versuche hatten gezeigt, daß die Inaktivierung der Citrat-Lyase an Elektronentransport- und/oder Phosphorylierungsvorgänge in der Membran gekoppelt ist. Dieser Mechanismus könnte Anlaß zur Vermutung sein, daß die Citrat-Lyase in der Zelle membrangebunden vorliegt. Durch Vergleich mit zwei "Leitenzymen" ("NADH-Oxidase" als membrangebundenes System und Malat-Dehydrogenase als cytoplasmatisches Enzym) sollte dies geprüft werden. Tabelle 6 zeigt, daß die Citrat-Lyase-Aktivität zur Hälfte in der Membranfraktion zu finden war. Eine Kontrolle zeigte jedoch, daß das Enzym offensichtlich auf Grund seiner Größe (s. Einleitung) unter den gegebenen Zentrifugationsbedingungen zum Teil sedimentierte. Es kann somit aus diesem Versuch nicht gefolgert werden, daß das Enzym in der Zelle membrangebunden ist.

Trotzdem muß man annehmen, daß das Enzym in der Zelle in einer speziellen Anordnung vorliegt. Im inneren einer Bakterienzelle herrscht hoher osmotischer Druck. Citrat-Lyase wird in vitro schon durch relativ geringen Osmosedruck gehemmt (BUCKEL, BUSCHMEIER und EGGERER, 1971). Weiterhin gibt es in vivo - wie gezeigt wurde - keine Reaktionsinaktivierung.

Die Citrat-Lyase muß in vivo in einer Form arrangiert sein, die diese beiden Effekte (Hemmung durch osmotischen Druck sowie Reaktionsinaktivierung) verhindert. Für eine direkte Assoziation der Citrat-Lyase mit der Membran konnten jedoch keine Hinweise erhalten werden.

Tab. 6 Lokalisation der Citrat-Lyase

Puffer	Citrat-Lyase Überst. % Akt.	Citrat-Lyase Membrfr. % Akt.	"NADH-Oxidase" Überst. % Akt.	"NADH-Oxidase" Membrfr. % Akt.	Malat-DH Überst. % Akt.	Malat-DH Membrfr. % Akt.
I	44	56	10	90	91	9
II	46	54	11	89	97	3
III	46	54	10	90	98	2
I (Kontrolle)[1]	62	38				

Aus anaerob auf Citrat gewachsenen Zellen (E. aerogenes) wurde ein membranhaltiger Rohextrakt hergestellt wie in Material und Methoden beschrieben. Dieser Extrakt wurde 90 min bei 100 000 g zentrifugiert. Im Überstand und in der Membranfraktion (in wenig Puffer aufgenommen) wurden die spezifische Citrat-Lyase-Aktivität und die spezifischen Aktivitäten der beiden Leitenzyme "NADH-Oxidase" und Malat-Dehydrogenase bestimmt. Die Verteilungen der Aktivitäten in Membranfraktion und Überstand wurden in der Tabelle in Prozent der Gesamtaktivität angegeben.

[1] Die Kontrolle war eine Citrat-Lyase-Lösung, die ebenfalls der Zentrifugation unterworfen wurde.

Puffer I: 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7; 2 mM $MgCl_2$
Puffer II: 10 mM " " "
Puffer III: 1 mM " " "

2.2. Regulation der Citrat-Lyase in E. coli

Die bisher geschilderten Versuche bestärkten den Verdacht, daß die Inaktivierung der Citrat-Lyase in E. aerogenes durch Elektronentransport-Vorgänge hervorgerufen wurde. Diese Ergebnisse sollten durch Versuche mit Mutanten untermauert werden. Es empfahl sich der Einsatz von Stämmen, die im respiratorischen Apparat gestört sind. Solche Defekte sollten unter Umständen Auswirkungen auf den Citrat-Lyase-Inaktivierungsvorgang haben. Es wäre nicht günstig gewesen, solche Mutanten von E. aerogenes

zu isolieren, da es sehr zeitaufwendig ist, den erzeugten Block in dem komplexen Atmungssystem genau zu lokalisieren. Günstiger schien es, für diese Versuche die systematische Verwandtschaft von E. aerogenes zu E. coli auszunutzen und sich der sehr intensiv beschriebenen E. coli-Mutanten zu bedienen (Übersichtsartikel über Arbeiten mit E. coli Elektronentransport- und Energiekopplungs-Mutanten: COX und GIBSON, 1974).

Zwei wesentliche Eigenschaften haben Citrat-Lyasen aus E. coli und aus E. aerogenes gemeinsam: a) sie sind im Rohextrakt stabil; b) sie zeigen Reaktionsinaktivierung (WHEAT und AJL, 1955). Zunächst wurde angenommen, daß es in E. coli genau wie in E. aerogenes keine in vivo-Reaktionsinaktivierung der Citrat-Lyase gibt. Die im Kapitel 2.2.2. geschilderten Mutanten-Versuche bestätigen diese Annahme.

Es bestand jedoch eine prinzipielle Schwierigkeit: E. coli scheint seine Citrat-Lyase ganz anders zu regulieren als E. aerogenes. Citratverwertung ist E. coli nur möglich, wenn noch eine andere günstige C-Quelle zur Verfügung steht und außerdem Pepton vorhanden ist (VAUGHN et al., 1950). Es ist bekannt, daß die Membran von E. coli normalerweise für Citrat undurchlässig ist (LARA und STOKES, 1952; ARIMA, WATANABE und BEPPU, 1972). Das daraus resultierende Unvermögen von E. coli auf Citrat zu wachsen, wird im sogenannten IMViC-Test zur Differenzierung zwischen E. coli und E. aerogenes ausgenutzt. Unter anaeroben Bedingungen scheint Pepton diesen Transportblock aufzuheben: In einem Citrat plus Glucose Medium in Abwesenheit eines komplexen Bestandteils wurde nur sehr wenig Citrat verbraucht (Tab. 7, Zeile 3), obwohl Citrat-Lyase bis zum normalen "level" induziert und aktiv vorhanden war (Tab. 8, Zeile 3). Pepton war durch vitaminfreie Casaminosäuren, nicht jedoch durch Glutamat ersetzbar (Tab. 7, Zeile 2 und 4). Aus dieser Tabelle (s. die beiden letzten Zeilen) geht weiterhin hervor, daß der Verbrauch von Citrat nur wenig Einfluß auf das Wachstum hatte. Offensichtlich hat Citrat als Substrat für E. coli nur wenig Bedeutung.

Tab. 7 Anaerobes Wachstum von E. coli auf Citrat

Medium Glucose g/l	Medium Citrat g/l	Zusatz	Glucose (mM) einges.	Glucose (mM) verbraucht	Citrat (mM) einges.	Citrat (mM) verbraucht	End-O.D. 500 nm
1	5	Pepton	5,6	5,6	17	10,4	1,5
1	5	Casamsre.	5,6	5,6	17	9	1,2
1	5	-	5,6	5,6	17	0,6	0,5
1	5	Glutamat	5,6	5,6	17	0,6	0,5
7,2	2,9	Pepton	40	35	10	10	2,2
7,2	5	Pepton	40	38	17	12	2,9
7,2	0	Pepton	40	37	0	0	2,7

Die Messungen wurden nach 12 Stunden vorgenommen. Die Kulturen waren zu diesem Zeitpunkt ausgewachsen.

Tab. 8 Citrat-Lyase-Aktivität in E. coli nach Wachstum in verschiedenen Medien

Medium Glucose g/l	Medium Citrat g/l	Zusatz	CL-Aktivität E/mg Prot.	CL-Aktivität E/mg Prot. nach Acetyl.	Inak.-Faktor[1]
1	5	Pepton	0,006	0,1	16,4
7,2	5	Pepton	0,28	0,28	1
7,2	5	-	0,23	0,28	1,2
10	5	Casamsre.	0,22	0,24	1,1
7,2	2,9	Pepton	0,28	0,33	1,2

Die Messungen wurden nach 12 Stunden anaeroben Wachstums vorgenommen. Die Kulturen waren zu diesem Zeitpunkt ausgewachsen.

[1] Der Inaktivierungsfaktor ist die Citrat-Lyase-Aktivität nach Acetanhydridbehandlung geteilt durch die Aktivität, die ohne Acetylierung erreicht wurde.

DAGLEY (1954) beschäftigte sich näher mit dem Einfluß der Glucose auf die Citrat-Vergärung. Er stellte fest, daß die Citrat-Lyase sehr zügig inaktiviert wurde, wenn die Glucose im Medium aufgebraucht war; Citrat war im Überschuß vorhanden. Gab er nach Inaktivierung wieder Glucose zu, so erfolgte eine Reaktivierung des Enzyms. Eigene Versuche zu diesem Problem sind in Tab. 8 dargestellt. Zeile 1 zeigt, daß die Inaktivierung eine Desacetylierung war.

Wenn Glucose im Überschuß vorhanden war (Tab. 8, Zeile 2 bis 5), so blieb die Aktivität der Citrat-Lyase erhalten, auch wenn Citrat begrenzend war (Zeile 5). Diese Regulation der Citrat-Lyase macht keinen Sinn und verstärkt den Eindruck, daß es sich bei der Citrat-Vergärung um einen rudimentären Cokatabolismus handelt.

Die Tatsache, daß in E. coli unter anaeroben Bedingungen und in Abwesenheit von Nitrat Citrat-Lyase inaktiviert werden konnte, scheint dem Postulat zu widersprechen, daß Inaktivierung durch Elektronentransport- und/oder Phosphorylierungsvorgänge hervorgerufen wird. Tatsächlich aber induziert E. coli unter den gegebenen Bedingungen ein anaerobes Elektronentransportsystem mit Fumarat als Endacceptor (HIRSCH et al., 1963; SPENCER und GUEST, 1973). Als direkter Beweis dafür, daß aus diesem Reduktionsschritt (Fumarat zu Succinat) Energie gewonnen wird, kann gelten, daß E. coli unter anaeroben Bedingungen auf einem Malat- oder Fumarat-Medium wächst, wenn H_2 vorhanden ist. Dabei wird als Gärungsendprodukt fast ausschließlich Succinat gebildet (MACY, KULLA und GOTTSCHALK, 1976). Im zellfreien System wurde ebenfalls eine Energetisierung der Membran bzw. ATP-Bildung mit Fumarat als $\bar{e}$-Endacceptor nachgewiesen (BOONSTRA, HUTTUNEN, KONINGS und KABACK, 1975; HADDOCK und KENDALL-TOBIAS, 1975; MIKI und LIN, 1975). Dieses anaerobe Elektronentransportsystem ist nicht auf E. coli beschränkt, sondern findet sich noch bei einer ganzen Reihe weiterer Mikroorganismen (Literaturübersicht bei MACY, PROBST und GOTTSCHALK, 1975).

E. aerogenes induzierte dieses System nicht bei anaerobem Citrat-Wachstum. Es kam zu keiner Succinat-Ausscheidung (Kapitel 2.1.1.), auch wenn mit Wasserstoff begast wurde. In einem weiteren Wachstumsversuch mit E. aerogenes wurde der Schritt vom Oxalacetat zum Pyruvat durch Na^+-Mangel gehemmt. Es wurde mit H_2 begast. Unter diesen Bedingungen wäre nur der Stoffwechselweg zum Succinat möglich gewesen; es kam jedoch zu keinem Wachstum (Die Oxalacetat-Decarboxylase von E. aerogenes ist Na^+-abhängig: STERN, 1967; O'BRIEN und STERN, 1969).

Es wäre also möglich, daß auch die anaerobe Citrat-Lyase-Inaktivierung in E. coli durch Elektronentransportvorgänge ausgelöst wird. In Kapitel 2.2.2. wird gezeigt, daß tatsächlich eine enge Beziehung besteht zwischen Fumarat-Reduktase und anaerober Inaktivierung der Citrat-Lyase. Fraglich bleibt jedoch, warum Glucose die anaerobe Inaktivierung verhinderte und sogar die Reacetylierung inaktivierter Citrat-Lyase bewirkte. Die einfachste Erklärung wäre, daß aus Glucose ständig das zur Reaktivierung notwendige aktive Acetat (nach SCHMELLENKAMP und EGGERER, 1974: Acetyladenylat) regeneriert würde.

Diese spezielle Eigenschaft des im Anaeroben inaktivierenden Systems erlaubte es, aerobe und anaerobe Inaktivierung unabhängig voneinander zu testen. Die Zellen wurden anaerob auf einem Medium mit Glucose, Citrat und Pepton (oder vitaminfreie Casaminosäuren) angezogen. Um eine Inaktivierung der Citrat-Lyase zu verhindern, war Glucose dabei im Überschuß vorhanden. Anschließend wurde für die anaerobe Inaktivierung anaerob in einem Medium mit Citrat aber ohne Glucose inkubiert, für die aerobe Inaktivierung dagegen aerob in einem Glucose-haltigen Medium (die genaue Durchführung ist im methodischen Teil dargestellt).

Das Ergebnis eines solchen Versuches ist in Tab. 9, Zeile 2 dargestellt. Die aerobe Inaktivierung verlief ungefähr doppelt so schnell wie die anaerobe. Eine Kontrolle (keine anaerobe Inaktivierung wenn Glucose vor-

handen) zeigte, daß der Luftausschluß bei dieser Inkubation genügte, um den aeroben Inaktivierungsmechanismus wirkungsvoll zu verhindern. Eine zweite Kontrolle zeigte, daß ohne C- und Energiequelle (bzw. Donator von Reduktionsäquivalenten) keine anaerobe Inaktivierung eintrat. Dieses Verhalten entsprach der (aeroben) Inaktivierung bei E. aerogenes (Tab. 2).

In Tab. 9 wurde außerdem ein Versuch erfaßt, in dem ein anderes Medium für den Inaktivierungsansatz getestet wurde. Dieses vitaminfreie Medium wurde für die Versuche mit den Mutanten eingesetzt. Die hier aufgetretenen Inaktivierungsfaktoren waren nur etwa halb so groß wie im Pepton-Medium.

Tab. 9 Aerobe und anaerobe Inaktivierung der Citrat-Lyase in E. coli

Anzuchtmedium Glucose g/l	Citrat g/l	Zusatz	Inak.-Fakt.[1] vor Inkub.	Inak.-Fakt.[1] nach aerober Inkubation	Inak.-Fakt.[1] nach anaerober Inkubation
1	5	Pepton	16,4	34	
7,2	5	Pepton	1,2	10,5	4,1 1,3[2] 1,4[3]
10	5	Casamsre.	1	4,3	2,4

Die Zellen waren 12 Stunden anaerob in dem angegebenen Medium gewachsen. Anschließend wurde 1 Stunde aerob (Glucose-Medium) oder anaerob (Citrat-Medium) inkubiert wie im methodischen Teil beschrieben. Die Citrat-Lyase-Aktivitäten (± Acetanhydrid) wurden vor und nach der aeroben bzw. anaeroben Inkubation bestimmt.

[1] Der Inaktivierungsfaktor ist die CL-Aktivität nach Acetanhydridbehandlung geteilt durch die Aktivität, die ohne Acetylierung erreicht wurde.

[2] Kontrolle: Das anaerobe Inkubationsmedium enthielt zusätzlich Glucose.

[3] Das anaerobe Inkubationsmedium enthielt weder Citrat noch Glucose.

2.2.1. Wirkung von Hemmern und Entkopplern des Elektronentransportes auf die aerobe und anaerobe Citrat-Lyase-Inaktivierung von E. coli

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die Hemmstoffe und Entkoppler der e^--Transportkette, die auf die Citrat-Lyase-Inaktivierung von E. aerogenes eine zum Teil stark hemmende Wirkung hatten (Tab. 4), auch auf die in E. coli ablaufende aerobe und anaerobe Inaktivierung Einfluß hatten. Das Ergebnis ist in Tab. 10 dargestellt. Das Verhalten der aeroben Inaktivierung entsprach dem von E. aerogenes: nur schwach wirksam waren der Hemmer DCCD und der Entkoppler CCCP, eine sehr effektive Hemmung der Inaktivierung wurde durch DNP erreicht; PCP war in E. coli anders als in E. aerogenes nur von relativ schwacher Wirksamkeit. Die anaerobe Inaktivierung wurde ebenfalls behindert, sie stellte sich jedoch als deutlich unsensibler gegenüber den Atmungsgiften heraus.

Tab. 10 Einfluß von Hemmern und Entkopplern der Elektronentransportkette auf die aerobe und anaerobe Inaktivierung der Citrat-Lyase in E. coli

	Bedingungen im Inaktivierungsansatz	Konz. (mM)	% Hemmung der Inaktivierung
aerob	vollständiger Ansatz	-	0
	+ DCCD[1]	0,1	35
	+ CCCP[1]	0,002	26
	+ PCP	1	70
	+ DNP	2	93
anaerob	vollständiger Ansatz	-	0
	+ DCCD[1]	0,1	0
	+ PCP	1	11
	+ DNP	2	54

Legende s. Seite 68.

Legende zu Tab. 10:

Die Zellen waren 12 Stunden anaerob auf dem Citrat/Glucose/Pepton-Medium gewachsen. Anschließend wurde 1 Stunde aerob (Glucose-Medium) oder anaerob (Citrat-Medium) mit oder ohne Effektor inkubiert wie im methodischen Teil beschrieben. Danach wurden die Citrat-Lyase-Aktivitäten vor und nach Acetylierung bestimmt. Die im vollständigen Ansatz erzielte Inaktivierung wurde als 0 % Hemmung definiert. Das Ausbleiben einer Inaktivierung gilt als 100 % Hemmung.

[1] DCCP und CCCP wurden in Äthanol gelöst und im Verhältnis 1 : 1000 in den Ansatz gegeben.

2.2.2. Inaktivierung der Citrat-Lyase in elektronentransport- und energiekopplungsgeschädigten Mutanten von E. coli K 12

Fünf verschiedene Typen von Mutanten wurden in diesem Versuch eingesetzt (Tab. 11): Zwei Mutanten, die Cytochrome nur bilden können, wenn das Wachstumsmedium mit 5-Aminolaevulinsäure supplementiert wird (hem A^-), zwei Mutanten, die kein Ubichinon mehr bilden können (ubi$^-$), eine Mutante mit einem Defekt in der Menachinon-Synthese (men A^-), eine Mutante, die keine oder nur noch eine deffekte Fumarat-Reduktase bilden kann (frd$^-$) sowie vier Mutanten aus der Gruppe der "uncoupled" Mutanten (unc A^- und unc B^-).

Ubichinon sowie Cytochrom-negative Mutanten können keinen vollständigen Elektronentransport durchführen (COX und GIBSON, 1974). Das heißt jedoch nicht, daß der gesamte Apparat der membrangebundenen Redoxvorgänge unfunktionell wird. Entscheidend ist, daß diese Mutanten die Membran ATP-abhängig über die ATPase energetisieren können*. Die von diesem Zustand direkt abhängigen Prozesse (wie z. B. Kaback-Transport (SIMONI und SHALLENBERGER, 1972) oder Transhydrogenase (COX et al., 1971)) bleiben funktionell, solange der Zelle genügend ATP zur Verfügung steht.

---

* Die Zelle kann die Membran über zwei voneinander unabhängige Systeme energetisieren: 1) durch Elektronentransport, 2) über die ATPase unter ATP-Hydrolyse (KLEIN und BOYER, 1972).

Tab. 11 Aerobe und anaerobe Inaktivierung der Citrat-Lyase in Mutanten von E. coli K 12

Mutante[1]	relevanter Mutations-typ	Phänotyp	O.D.500 nm nach 12 Std. Wachstum	CLE/mg Prot. nach Acetyl. vor Inkub.	Inak.-Fakt.[5] vor Inkubation	Inak.-Fakt.[5] n. aerober Inkubation	Inak.-Fakt.[5] n. anaerober Inkubation
K 12	-	Wildtyp	2,4	0,2	1	4,3	2,4
K 12	-	Wildtyp[2]	2,4	0,14	1,1	2,8	
AN 120	unc A$^-$	entkoppelt, ATPase$^-$	2,9	0,14	1,2	4,4	2,6
DG 20/1	unc A$^-$	entkoppelt, ATPase$^-$	1,9	0,19	1	1,9	
BH 273	unc A$^-$	entkoppelt, ATPase$^-$, Basisteil defekt	0,5	0,073	2,2	11,5	
DG 26/4	unc B$^-$	entkoppelt, ATPase$^+$, Basisteil defekt	2,0	0,14	1,1	2,5	
A 1004 c	hem A$^-$	Cytochrom$^-$	1,1	0,038	1,1	7,5	1
"	"	Cytochrom$^+$ 2	1,8	0,14	1,1	1,4	2,2
SASX 76	hem A$^-$	Cytochrom$^-$	1,3	0,053	0,93	0,89	0,84
"	"	Cytochrom$^+$ 2	3	0,14	0,93	0,79	0,81
"	"	Cytochrom$^+$ 3	3	0,24	0,88	0,86	0,93
"	"	Cytochrom$^+$ 4	2,3	0,23	0,91	0,89	0,91
S 80	ubi$^-$	Ubichinon$^-$	1	0,063	1,7	8,3	8,7
AN 385	ubi A$^-$	Ubichinon$^-$	3	0,1	0,86	2,3	
AN 99	men A$^-$	Menachinon$^-$	0,7	<0,0005			
WGAS	-	Wildtyp, Elter zu frd 11	1,4	0,18	1,3	4,2	6,3
frd 11	frd$^-$	Fumarat-Reduktase$^-$	1	0,21	1,4	6,4	2

Legende s. Seite 70.

Legende zu Tab. 11:

Durchführung wie in Tabelle 9 und im methodischen Teil beschrieben.

Die Werte sind zum Teil aus Parallelen gemittelt. Die Abweichungen waren vernachlässigbar.

[1]Genotyp und Herkunft der Mutanten siehe methodischer Teil

[2]Medium mit 100 mg δ-Als/l supplementiert

[3]Medium mit 4 mg δ-Als/l supplementiert

[4]Medium mit 2 mg Hämin/l supplementiert. Aus der Literatur geht nicht eindeutig hervor, ob der Cytochrom-Defekt dieser Mutante (SASX 76, früher SHSP 18; SINGH und BRAGG, 1975) in submerser Kultur durch Hämin supplementierbar ist (SASARMAN et al., 1968; HADDOCK und SCHAIRER, 1973). Aus dem hier dargestellten Experiment geht hervor, daß dies zumindest zum Teil möglich war: Erhöhung des Wachstums und der spezifischen Citrat-Lyase-Aktivität.

[5]Der Inaktivierungsfaktor ist die Citrat-Lyase-Aktivität nach Acetanhydridbehandlung geteilt durch die Aktivität, die ohne Acetylierung erreicht wurde.

Tab. 12 Aerobe und anaerobe Inaktivierung der Citrat-Lyase in Mutanten von E. coli K 12

	aerobe Inaktivierung	anaerobe Inaktivierung
Wildtyp	ja	ja
unc$^-$	ja	ja
hem$^-$ I	ja	nein
hem$^-$ I + δ-Als	nein	ja
hem$^-$ II	nein	nein
hem$^-$ II + δ-Als, + Hämin	nein	nein
frd$^-$	ja	nein

Diese Tabelle ist eine vereinfachte Wiedergabe von Tabelle 11.

Die Menachinon-negative Mutante kann normal atmen. Aerobes Wachstum auf Succinat ist ihr also noch möglich (COX et al., 1968). Offensichtlich kann Ubichinon die Funktionen des Menachinons zum Teil übernehmen (NEWTON, COX und GIBSON, 1971). Unter anaeroben Bedingungen wächst die Menachinon-negative Mutante nur in Gegenwart von Uracil. Der Grund hierfür ist, daß ein Oxidationsschritt in der Pyrimidin-Biosynthese (Dihydroorotat-Dehydrogenase) unter anaeroben Bedingungen Menachinon abhängig ist (NEWTON et al., 1971).

Die Fumarat-Reduktase-negative Mutante (frd$^-$) kann den anaeroben Elektronentransport mit Endacceptor Fumarat nicht mehr katalysieren. Folgerichtig kann diese Mutante nicht mehr anaerob mit Fumarat und Wasserstoff (MACY, KULLA und GOTTSCHALK, 1976) oder Glycerin und Fumarat wachsen (SPENCER und GUEST, 1973).

Die sogenannten entkoppelten Mutanten (unc$^-$) können atmen. Ihre Stoffwech-

selendprodukte bei aerobem Glucose-Wachstum unterscheiden sich nicht von denen des Wildstammes. Die Wachstumseffizienz ist jedoch geringer, da keine oxidative Phosphorylierung mehr möglich ist. Deswegen können sie nicht mehr auf Succinat wachsen (BUTLIN, COX und GIBSON, 1971). An der Kopplung zwischen Elektronentransport und Phosphorylierung sind mehr als zehn Polypeptide beteiligt (SIMONI und POSTMA, 1975). Je nachdem welches dieser Proteine durch den Block getroffen ist, zeigen die resultierenden unc$^-$-Mutanten ganz unterschiedliche Eigenschaften. Meist wird grob nach unc A$^-$ und unc B$^-$ eingeteilt (BUTLIN, COX und GIBSON, 1973; SIMONI und POSTMA, 1975; COX und GIBSON, 1974). unc A$^-$-Mutanten besitzen keine ATPase-Aktivität. Da dieser Multienzymkomplex auch strukturelle Membranfunktionen hat, kann es durch die Mutation zu einer erhöhten Protonenleitfähigkeit in der Membran kommen (ROSEN, 1973; ROSEN und ADLER, 1975; ALTENDORF, HAROLD und SIMONI, 1974; KADNER und WINKLER, 1975). Diese Protonendurchlässigkeit darf jedoch nicht so weit gehen, daß es der Zelle nicht mehr möglich ist, den elektrochemischen Membrangradienten aufrechtzuerhalten, da dieser für das Wachstum obligatorisch ist (SCHAIRER, 1975). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten unc A$^-$-Mutanten (AN 120, DG 20/1, BH 273) zeigen die normale Protonendurchlässigkeit der Membran (WILSON et al., 1976; SCHAIRER et al., 1976).

Die Mutante BH 273 stellt in gewisser Weise einen Sonderfall dar: Sie ist ATPase-negativ, darüber hinaus hat sie aber noch einen Defekt in einer membranintegrierten Funktion, dem sogenannten Basisteil der ATPase. Diese Proteine übertragen die Energie von der Membran auf den ATPase-Komplex. Entkoppelte Mutanten, die nur in diesem Basisteil gestört sind, aber noch normale ATPase-Aktivität zeigen, sind definitionsgemäß die unc B$^-$-Mutanten (SIMONI und POSTMA, 1975). Der Stamm BH 273 ist somit eine Kombination aus unc A$^-$ und unc B$^-$ (SCHAIRER et al., 1976). DG 26/4 ist eine unc B$^-$-Mutante (SCHAIRER et al., 1976).

Physiologisch lassen sich unc A$^-$-Mutanten von den unc B$^-$-Mutanten leicht

dadurch unterscheiden, daß erstere kein anaerobes Glucose-Wachstum zeigen (BUTLIN, COX und GIBSON, 1973). In Abwesenheit eines Elektronenacceptors muß die Membran über ATP und die ATPase energetisiert werden, und dieser energiereiche Membranzustand ist, wie oben bereits gesagt, für das Wachstum notwendig. Den ATPase-negativen unc A^--Mutanten ist diese Möglichkeit verwehrt. Anaerobes Glucose-Wachstum wird erst möglich, wenn ein Elektronenacceptor (Nitrat oder Fumarat) angeboten wird (ROSENBERG et al., 1975; YAMAMOTO et al., 1973). Erstaunlich ist, daß diese Mutanten das notwendige Fumarat nicht selbst aus der Glucose regenerieren können. Offensichtlich ist für das Funktionieren dieses Stoffwechselweges schon eine Energetisierung der Membran notwendig. Auf dem hier verwendeten anaeroben Medium (Glucose + Citrat + vitaminfreie Casaminosäuren) wuchsen auch die unc A^--Mutanten problemlos (Tab. 11). Wahrscheinlich diente Citrat als Quelle für den Elektronenendacceptor Fumarat.

Tabelle 11 zeigt, daß alle erfaßten Parameter durch die Elektronentransport- oder Kopplungsmutationen beeinflußt wurden. Zum Teil zeigten die Mutanten wie zu erwarten gehemmtes Wachstum. Auch die spezifischen Aktivitäten der Citrat-Lyase waren teilweise vermindert. Ganz besonders auffallend war, daß die Menachinon-negative Mutante keine Citrat-Lyase induzierte. Bereits in Kapitel 2.1.2.13 wurde vermutet, daß auch die Induktion bzw. Repression der Citrat-Lyase über einen Faktor reguliert wird, der in engem Zusammenhang mit der Atmungskette steht. Die Kopplung zur Induktion sollte nach dem hier dargestellten Ergebnis über Menachinon erfolgen.

Eine andere Erklärung für das Unvermögen der men^--Mutante, Citrat-Lyase zu induzieren, könnte mit dem Citrat-Transport im Zusammenhang stehen. Citrat wird über ein Kaback-System (KABACK, 1974) transportiert (JOHNSON, CHA und STERN, 1975). Dieses System ist jedoch von Menachinon unabhängig (COX und GIBSON, 1974).

In Tabelle 11 ist weiterhin dargestellt, wie sich die Inaktivierung der Citrat-Lyase in den Mutanten verhielt. Es wurde außerdem versucht, diese Ergebnisse vereinfachend in Tabelle 12 darzustellen.

Alle entkoppelten Mutanten konnten noch inaktivieren, wenn auch mit unterschiedlichen Raten. DG 20/1 zeigte nur relativ schwache Citrat-Lyase-Inaktivierungsaktivität. Die Doppelmutante BH 273 fällt etwas aus dem Rahmen. Verglichen mit den anderen unc$^-$-Mutanten hatte sie nur schwache Citrat-Lyase-Aktivität, wobei ein großer Teil von vorneherein inaktiv vorlag. Entsprechend stark war die Inaktivierung bei anschließender aerober Inkubation. Ähnliches galt für die ubi$^-$-Mutante S 80: Reduzierter Citrat-Lyase-Spiegel, zum erheblichen Teil inaktiv vorliegend; bei anschließender Inkubation starke Inaktivierungsaktivität. Das Verhalten der anderen ubi$^-$-Mutante (AN 385) entsprach mehr dem Wildstamm.

Besonders interessant war das Verhalten der Cytochrom-negativen Mutanten. SASX 76 hatte die Fähigkeit zur Inaktivierung vollständig verloren. Die Rekonstitution der Cytochrombildung in hem A$^-$-Mutanten ist möglich, wenn δ-Aminolaevulinsäure angeboten wird (COX und GIBSON, 1974). Das Wachstum sowie die Citrat-Lyase-Bildung konnte in diesem Stamm durch δ-Aminolaevulinsäure- sowie Häminzugabe stimuliert werden, die Inaktivierung der Citrat-Lyase war jedoch nicht rekonstituierbar.

Im anderen Cytochrom-negativen Stamm (A 1004 c) wurden ebenfalls Wachstum und spezifische Citrat-Lyase-Aktivität durch δ-Aminolaevulinsäurezugabe zum Wachstumsmedium erhöht. Dieser Stamm konnte - wenn cytochromfrei - aerob inaktivieren, die anaerobe Inaktivierung war verhindert. Ermöglichte man dieser Mutante die Cytochrombildung durch δ-Aminolaevulinsäuresupplementierung, so kehrte sich das Bild um: Die aerobe Inaktivierung war weitgehend geblockt, die anaerobe Inaktivierung rekonstituiert.

Zeile 2 in Tabelle 11 zeigt, daß δ-Aminolaevulinsäure in hoher Konzentra-

tion im Wachstumsmedium des Wildstammes ebenfalls Auswirkungen auf die Citrat-Lyase-Synthese und die Inaktivierungsaktivität hatte. Die Hemmung der Inaktivierung war jedoch im Vergleich zu den hem A^--Mutanten nur schwach.

Sieht man diese Ergebnisse zusammenfassend, so kommt man zu dem Schluß, daß die Cytochrome an der Kopplung zur Citrat-Lyase-Inaktivierung nicht direkt beteiligt sind. Vielmehr muß man annehmen, daß ein Faktor eine Rolle spielt, der in der Regulation seiner Bildung oder seines Einbaus in die Membran eng an das Cytochrom-System angebunden ist. Ein Block im Biosyntheseweg der Cytochrome muß Auswirkungen auf einen solchen Regelkreis haben. In der Diskussion wird hierauf näher eingegangen.

Aufschlußreich war das Verhalten der Fumarat-Reduktase-negativen Mutante im Vergleich zum Elternstamm. Die aerobe Inaktivierung war durch diese Mutation nicht betroffen; es zeigte sich jedoch, daß die anaerobe Inaktivierung stark gehemmt war. Dies kann als Bestätigung des obigen Postulats gewertet werden, daß die anaerobe Citrat-Lyase-Inaktivierung in E. coli ebenfalls durch Elektronentransportvorgänge ausgelöst wird, hier mit dem e^--Endacceptor Fumarat.

3. DISKUSSION

Das Vorkommen der Citrat-Lyase ist auf Prokaryonten beschränkt. In dem Cytoplasma der Eukaryonten findet sich ein Enzym, das eine vergleichbare Reaktion katalysiert, die ATP-Citrat-Lyase. Dieses Enzym spaltet ebenfalls Citrat, jedoch wird in der Reaktion ATP verbraucht. Die investierte Energie bleibt in den Spaltungsprodukten als Acetyl-CoA erhalten (SRERE und LIPMANN, 1953; SRERE, 1959). Die für die Reaktion notwendige Aktivierung des ansonsten reaktionsträgen αC des Acetats wird hier also auf im Stoffwechsel bewährte Weise in Form des Acetyl-CoA erreicht (LYNEN, 1953; DECKER, 1959). Das ist in diesem Falle doppelt sinnvoll, da es die Aufgabe der ATP-Citrat-Lyase ist, Acetyl-CoA als Baustein für die im Cytoplasma ablaufende Fettsäure-Biosynthese zur Verfügung zu stellen (LOWENSTEIN, 1968). Die Mitochondrienmembran ist undurchlässig für Acetyl-CoA, ausgeschleust werden kann anstelle dessen das Citrat. Durch räumliche Trennung des Citronensäure-Cyclus und der Fettsäureoxidation (Mitochondrien) von der Lyase-Reaktion und der Fettsäuresynthese (Cytoplasma) kann sich kein "futile cycle" aufbauen (GREVILLE, 1969).

Die Citrat-Lyase der Bakterien hat eine andere, eine katabolische Funktion. Mechanistisch ist für das Ablaufen der Reaktion ebenfalls eine Aktivierung des Reaktionspartners Acetat notwendig. Die Bakterienzelle könnte dies ebenfalls unter ATP-Investition über Acetyl-CoA erreichen. Dann wäre jedoch eine sich ausschließende Transacetylase-Reaktion notwendig, um die im Acetyl-CoA steckende Energie als ATP zurückzugewinnen. Ökonomisch spart die Zelle diese Folgeenzyme ein, indem es das Acetat auf dem "Enzymniveau" aktiviert: Es bildet sich ein Ester zwischen der reaktiven SH-Gruppe der Citrat-Lyase und dem Acetat. Die Bindungsenergie bleibt in der Reaktion durch Umesterung mit Citrat erhalten. Das Acetyl-Enzym wird durch Abspaltung von Oxalacetat regeneriert (s. Einleitung).

Die Bildung des Enzym-S-Acetyl als die aktive Enzymspecies gibt der Zelle die Möglichkeit, an dieser Stelle sehr effektiv mit der Regulation anzusetzen: Desacetylierung des Enzyms bedingt eine vollständige Inaktivierung, Acetylierung rekonstituiert die Aktivität. Diese Art der Regulation qualifiziert die Citrat-Lyase als "chemical modification" Enzym (HOLZER und DUNTZE, 1971) oder, wie man heute treffender sagt, als kovalent modifizierbares Enzym. Jedoch unterscheidet sich die Citrat-Lyase in einem bedeutenden Detail von allen anderen bisher beschriebenen kovalent modifizierbaren Enzymen: Die Modifikation findet nicht an einer speziellen regulatorischen Stelle des Enzyms sondern direkt im katalytischen Zentrum statt.

Kovalent modifizierbare Enzyme findet man häufig an Stellen im Stoffwechsel, an denen besonders strikte Regulation notwendig ist, besonders also dort, wo es gilt, den Aufbau eines "futile cycle" zu verhindern. Anders als die allosterische Kontrolle kann die Regulation durch kovalente Modifikation ausgesprochen scharf greifen. Das ist besonders dann der Fall, wenn ein Kaskaden-System von ebenfalls kovalent modifizierbaren Regulationsproteinen vorgeschaltet ist. Jede Stufe wirkt als Verstärker. Diese hierarchisch aufgebauten Regulationssysteme werden bei kovalent modifizierbaren Enzymen regelmäßig beobachtet. Als Beispiel seien angeführt die Enzyme des Glykogen-Stoffwechsels im Muskel (FISCHER et al., 1971; KREBS, 1972) sowie die Glutamin-Synthetase in E. coli (ADLER, PURICH und STADTMAN, 1975).

Die Bildung von Estern zwischen Enzym und Substrat bzw. Produkt oder Zwischenprodukt ist in der Enzymatik nicht ungewöhnlich. Allerdings entstehen die Ester meist nur intermediär. Prominenteste Beispiele für Enzyme, die ihre Reaktion auf diese Art katalysieren - man spricht von kovalenter Katalyse - sind das Chymotrypsin und die Phosphotriose-Dehydrogenase. Die Bildung von stabilen Acyl-Enzymestern, wie das bei der Citrat-Lyase verwirklicht wurde, scheint eine Spezialität der Pantethein-haltigen

Enzyme zu sein (Gramicidin-S-Synthetase: KLEINKAUF et al., 1969; 6-Methylsalicylsäure-Synthetase: DIMROTH et al., 1972; Fettsäure-Synthetase: LYNEN, 1961; PRESCOTT und VAGELOS, 1972). Die Reaktionsmechanismen dieser Enzyme sind jedoch nicht mit dem der Citrat-Lyase oder der eng verwandten Citramalat-Lyase (BUCKEL und BOBI, 1976) zu vergleichen, da ihnen der Substratdurchsatz über den typischen "turn over" unter Regeneration des Acetyl-Enzyms fehlt (s. Einleitung). Es soll erwähnt sein, daß für keines dieser Enzyme ein Regulationsmechanismus beschrieben wurde, der der Regulation der Citrat-Lyase vergleichbar wäre und am Acyl-Enzymester angreifen würde.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zu beobachten, wie die Regulation der Citrat-Lyase in intakten Enterobakterien vollzogen wird. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Inaktivierung des Enzyms gerichtet werden. In Rhodopseudomonas gelatinosa war von GIFFHORN und GOTTSCHALK (1975) ein Citrat-Lyase-inaktivierendes (desacetylierendes) Enzym beschrieben worden. Die Regulation verläuft hier physiologisch sinnvoll über den Glutamat-pool. Bei E. aerogenes mußte ein anderer Regulationsmechanismus vermutet werden.

Der umgekehrte Prozeß, die Aktivierung bzw. Acetylierung wurde von den Arbeitsgruppen SRERE und EGGERER untersucht (SINGH et al., 1973; SCHMELLENKAMP und EGGERER, 1972; 1974). Schmellenkamp fand ein neues Enzym, die Acetat : SH- Acyl-carrier-Protein Enzym-Ligase (AMP), die desacetylierte Citrat-Lyase aus E. aerogenes mit Hilfe von Acetat und ATP in die aktive, acetylierte Form überführt. ATP und Acetat waren durch Acetyladenylat ersetzbar. Selbstverständlich muß auch dieses regulierende Protein reguliert werden. Die Beobachtung der Reaktivierung der Citrat-Lyase in einigen in vivo-Versuchen, die in der vorliegenden Arbeit dargestellt sind, zeigte , daß das aktivierende Enzym angeschaltet wurde, wenn Citrat vorlag und anaerobe Bedingungen herrschten. Glucose übte im Anaeroben eine schwache katabolische Repression auf die Bildung von Citrat-

Lyase aus, hemmte aber nicht die Reaktivierung.

Die schnellste in vivo-Inaktivierung der Citrat-Lyase wurde erreicht, wenn anaerob auf Citrat gewachsene Zellen sich an aerobes Glucose-Wachstum adaptieren mußten. Die Inaktivierung lief ohne erkennbare lag-Phase sofort mit maximaler Geschwindigkeit an. Proteinsynthese war nicht notwendig. Die Halbwertszeit des bis zur vollständigen Inaktivierung ablaufenden Prozesses betrug 20 min. Als Vergleich: Die Inaktivierung, d. h. Adenylylierung der Glutamin-Synthetase (WULFF, MECKE und HOLZER, 1967; KINGDON, SHAPIRO und STADTMAN, 1967), die als Folge eines Ammonium-Pulses zu einer mit Prolin als Stickstoffquelle wachsenden E. coli-Kultur eintrat, war bedeutend schneller (Halbwertszeit 20 sec). Hier blieben jedoch 10 % Restaktivität erhalten (SCHUTT und HOLZER, 1972).

Aus einer Reihe weiterer shift-Versuche konnte gefolgert werden, daß es in der Zelle keine Reaktionsinaktivierung der Citrat-Lyase gibt. Die beobachtete in vivo-Inaktivierung der Citrat-Lyase sollte demnach durch ein inaktivierendes Enzym katalysiert werden. Es gelang aber nicht, das Vorhandensein eines solchen Enzyms im zellfreien Extrakt zu zeigen. Dies machte Überlegungen notwendig, ob hier eventuell ein alternativer Mechanismus vorliegt. Zu einer weiterführenden Idee verhalf ein Experiment, in dem von Citrat- auf Glucose-Wachstum bei Beibehaltung der anaeroben Bedingungen umgeschaltet wurde. Überraschend wurde bei diesem Übergang die Citrat-Lyase nicht inaktiviert. Bei anaerobem Glucose-Wachstum eröffnet Citrat-Synthase den Biosyntheseweg zum Glutamat. Paralleles Vorliegen von Citrat-Lyase-Aktivität wirkt antagonistisch und sollte zu einem Verarmen der Zelle an Glutamat führen. Tatsächlich zeigten die Zellen in dieser Übergangsphase (Citrat anaerob ⟶ Glucose anaerob) Wachstumsschwierigkeiten. Angebotenes α-Ketoglutarat (anstelle des Glutamats) wurde nur in dieser Phase aufgenommen und konnte den Verlust an Zellkonzentration in der kontinuierlichen Kultur zum Teil ausgleichen. Dies zeigt

deutlich, daß die Inaktivierung der Citrat-Lyase in E. aerogenes nicht wie in R . gelatinosa (GIFFHORN und GOTTSCHALK, 1975) über den Glutamat- oder einen verwandten pool reguliert wird. Es überrascht, daß die Zelle das Absinken des Glutamat-pools als wichtiges intrazelluläres Signal außer acht läßt. Man gewinnt den Eindruck, als sei Sauerstoff für die Inaktivierung der Citrat-Lyase notwendig. Um zu differenzieren, ob der Sauerstoff direkt wirkt oder über einen von ihm anhängigen Prozeß, wie ihn die Atmung darstellt, wurde in einem weiteren shift-Experiment der Sauerstoff durch Nitrat "ersetzt". Tatsächlich wurde bei Umschalten auf anaerobes Glucosewachstum mit Nitrat die Citrat-Lyase inaktiviert. Nitrat dient in Enterobakterien als terminaler Elektronenacceptor einer Elektronentransportkette. Elektronendonator für dieses System ist in vivo fast ausschließlich Formiat. Der anaerobe Gärungsstoffwechsel läuft auch in Gegenwart von Nitrat weiter (PAYNE, 1973).

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Interesse, daß E. aerogenes nur mit stark verminderter Wachstumsrate auf einem anaeroben Citrat plus Nitrat-Medium wuchs. Das könnte das Resultat einer unter diesen Bedingungen mangelhaften Koordination auf der Enzymregulationsebene sein: Der Nitrat-abhängige Elektronentransport verursacht die Inaktivierung der Citrat-Lyase. Das aktivierende Enzym ist under der Bedingung "anaerob Citrat" angeschaltet und arbeitet ständig gegen den Inaktivierungsprozeß an. Es bildet sich also ein "futile cycle" auf Enzymregulationsebene, der für die Wachstumshemmung verantwortlich sein könnte.

Diese Experimente waren die ersten Hinweise darauf, daß die Inaktivierung der Citrat-Lyase gekoppelt sein könnte an das Ablaufen einer Respirationskette. Durch das weitere experimentelle Vorgehen sollte diese Vermutung unterstützt werden, und es sollten eventuell Hinweise gefunden werden, wie diese Kopplung mechanistisch gestaltet sein könnte.

Eine der interessantesten Eigenschaften von Membranen ist ihre Fähigkeit,

Prozesse zu koppeln, zwischen denen per se kein Zusammenhang besteht, wie zum Beispiel Elektronenfluß und oxidative Phosphorylierung oder die Energetisierung von so unterschiedlichen Prozessen wie die Transhydrogenase-Reaktion (COX et al., 1971), der Kaback-Transport (KABACK, 1974), die Geißelbewegung (LARSEN et al., 1974) und die Adsorption von Bakteriophagen (HANCOCK und BRAUN, 1976). Mehrere Faktoren bedingen die besonderen Schwierigkeiten, die bei der Untersuchung dieser Systeme entstehen: die undurchschaubare Komplexheit und Variabilität des Membranaufbaues sowie die Neigung dieser Systeme, bei der Präparation zu entkoppeln. Als wirkungsvolle Untersuchungsmethoden stellten sich das Arbeiten mit Hemmstoffen und Entkopplern sowie der Einsatz von im weitesten Sinne membrangeschädigten Mutanten heraus. Trotz einer großen Anzahl von Arbeiten ist es bisher nicht gelungen, für eine der Kopplungen einen Mechanismus anzugeben, der mit allen gesicherten experimentellen Daten in Einklang zu bringen ist. Dies gilt auch für die oxidative Phosphorylierung (PAPA, 1976; BOYER, 1975).

Im vorliegenden Fall bot sich zunächst an, die Gifte der Atmungskette in ihrer Wirksamkeit auf die Citrat-Lyase-Inaktivierung zu testen. Tatsächlich waren einige der Entkoppler ausgesprochen effektive Hemmer des Desacetylierungsprozesses. Aus dem sich ergebenden Wirkungsspektrum wurde gefolgert, daß weder der Zusammenbruch des Membranpotentials noch ein Verarmen der Zelle an Energie ursächlich für die beobachtete Hemmung der Inaktivierung gewesen sein konnte. Als Interpretationsmöglichkeit blieb, daß die wirksamen Entkoppler in direkter Form auf die Faktoren der Atmungskette wirkten, die für die Kopplung zur Citrat-Lyase-Inaktivierung verantwortlich sind. Für eine Reihe weiterer Kopplungssysteme wurde in der Literatur ein vergleichbares Verhalten beschrieben (Literaturangaben hierzu an entsprechender Stelle im experimentellen Teil).

Als Weiterführung dieser Versuche sollten in der Atmungskette geschädigte Mutanten auf ihre Citrat-Lyase-Inaktivierungsaktivität geprüft werden.

Eine ganze Reihe dieser Mutanten wurde in der Literatur für E. coli beschrieben (Übersichtsartikel: COX und GIBSON, 1974). Es wurde versucht, diese gut charakterisierten Stämme für die Inaktivierungsversuche einzusetzen. Die Schwierigkeit war jedoch, daß E. coli seine Citrat-Lyase anders zu regulieren scheint als E. aerogenes. Es war schon lange bekannt, daß die typischen E. coli-Stämme anaerob Citrat nur verwerten, wenn eine weitere günstige C-Quelle wie Glucose zur Verfügung steht (VAUGHN et al., 1950). Der Grund hierfür ist, daß es der Zelle nicht möglich ist, ohne diese Supplementierung die Citrat-Lyase im aktiven Zustand zu erhalten.

E. coli induziert unter den verwendeten Bedingungen ein Elektronentransportsystem mit Fumarat als e^--Endacceptor. Es wurde nun vermutet, daß auch bei E. coli die Inaktivierung der Citrat-Lyase durch Elektronentransport und/oder Phosphorylierungsvorgänge in der Membran ausgelöst wird, und daß die beobachtete anaerobe Inaktivierung auf die Fumarat-Reduktion zurückzuführen ist. Unterstützt wurde diese Vermutung dadurch, daß eine Fumarat-Reduktase-negative Mutante im Anaeroben nur noch schwache Inaktivierungsaktivitäten zeigte.

Der Effekt der Glucose (Aufrechterhalten der Citrat-Lyase-Aktivität) könnte darin liegen, daß ständig aktiviertes Acetat (Acetyl-Adenylat) für die Reaktivierung zur Verfügung gestellt wird. Eine ähnliche Situation ergab sich für das Wachstum von E. aerogenes auf Citrat plus Nitrat. Die auftretende Wachstumshemmung wurde auf ein Verarmen der Zelle an aktivem Acetat zurückgeführt, da Aktivierung und die durch Nitrat-Atmung ausgelöste Inaktivierung der Citrat-Lyase in einem "futile cycle" ständig gegeneinander arbeiteten. Glucose hob diese Wachstumshemmung auf.

Im ganzen gesehen macht die Regulation der Citrat-Lyase in E. coli keinen Sinn. Scheinbar hat Citrat als Substrat im Aeroben wie im Anaeroben keine Bedeutung für diesen Mikroorganismus. Anaerobe Citrat-Verwertung

scheint nur noch als rudimentärer Cokatabolismus vorhanden zu sein.

Unter diesem Blickwinkel betrachtet, unterscheidet sich die Inaktivierung der Citrat-Lyase in E. coli nicht prinzipiell von der in E. aerogenes. Dies schaffte die Voraussetzungen für ein sinnvolles Einsetzen der elektronentransport- oder energiekopplungsgeschädigten E. coli-Mutanten im Citrat-Lyase-Inaktivierungsansatz.

ATPase negative und energiekopplungsgeschädigte Mutanten zeigten weitgehend normale Inaktivierungsraten. In diesen Stämmen funktionieren der Elektronentransport und die Atmung, jedoch ist die Kopplung an die Energiegewinnung unterbunden.

Auch Mutanten mit geblocktem e^--Fluß (ubi^-; COX und GIBSON, 1974) konnten die Citrat-Lyase inaktivieren. Trotz des Defektes kann die Membran in diesen Mutanten mit ATP über die ATPase energetisiert werden (KLEIN und BOYER, 1972). Gekoppelte Prozesse, die von diesem Zustand abhängig sind, bleiben funktionsfähig. Als Beispiele seien angeführt die Transhydrogenase (COX et al., 1971) und der Kaback-Transport (SIMONI und SHALLENBERG, 1972; PARNES und BOOS, 1973).

Die Menachinon-negative Mutante konnte die Citrat-Lyase nicht mehr induzieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß auch die Induktion der Citrat-Lyase in Abhängigkeit von Elektronentransportvorgängen reguliert wird. Zur selben Überlegung gab der Umschaltversuch von anaerobem auf aerobes Citrat-Wachstum unter Sulfatmangel-Bedingungen Anlaß; vermutlich infolge einer unter diesen Bedingungen alterierten Atmungskette (s. S. 39) konnte die Citrat-Lyase nicht mehr inaktiviert werden. Darüber hinaus trat auch die Repression der Citrat-Lyase-Bildung, wie sie bei Wachstumsbegrenzung durch Ammonium beobachtet wurde, nicht ein.

Es ergibt sich eine Parallele zur Regulation der Bildung der dissimilatori-

schen Nitrat-Reduktase in E. coli. Dieses Enzym unterliegt einer Induktion durch Nitrat und einer Repression durch Sauerstoff (SHOWE und DeMOSS, 1968), wobei O_2 wiederum nicht direkt wirkt (PAYNE, 1973). Auf Grund einer biphasischen Induktionskinetik sowie einer Reihe flankierender Versuche postulierten diese Autoren einen Redox-sensitiven Repressor. Ergänzend beobachteten SIMONI und SHALLENBERG (1972), daß O_2 in einem atmungsdefekten E. coli-Stamm (wahrscheinlich ubi$^-$) die Bildung der Nitrat-Reduktase nicht mehr reprimieren konnte.

Die Arbeitsgruppe STOUTHAMER zeigte, daß das komplizierte System der Reduktasen in Proteus mirabilis (Sauerstoff-Atmung, Nitrat-Reduktase, Fumarat-Reduktase, Chlorat-Reduktase, Thiosulfat-Reduktase und Tetrathionat-Reduktase) auf ganz ähnliche Weise reguliert wird (DeGROOT und STOUTHAMER, 1969; 1970; VAN DER BEEK, 1976; OLTMANN, 1976). Die Reduktasen sind in einer Hirarchie angeordnet, wobei das jeweils "höher" stehende System die "darunter" liegenden reprimiert. Mit Hemmstoff- und Mutanten-Versuchen konnten die Autoren überzeugende Hinweise dafür liefern, daß nicht die Elektronenacceptoren die Repressoren sind, sondern daß vielmehr erst das Ablaufen des Elektronenflusses die Repression auslöst.

Interessanterweise unterliegen die Nitrat-, Thiosulfat- und Tetrathionat-Reduktasen in Proteus mirabilis neben der Repression auch einer Inaktivierung, die ebenfalls durch Elektronentransportvorgänge bewirkt wird (DeGROOT und STOUTHAMER, 1970 a; b; die Nitrat-Reduktase in E. aerogenes wird im Aeroben ebenfalls inaktiviert: VAN'T RIET et al., 1968). Hier ergeben sich Parallelen zur Inaktivierung der Citrat-Lyase. Unter Azid-Einwirkung bildet Proteus mirabilis eine veränderte Elektronentransportkette (vergleiche oben Sulfat-Mangel). Derart adaptierte Zellen konnten die Thiosulfat- und Tetrathionat-Reduktase nicht mehr inaktivieren (DeGROOT und STOUTHAMER, 1970 b). Eine an Cytochromen verarmte, 5-Aminolaevulinsäure-bedürftige Mutante von Proteus mirabilis (5-Amino-

laevulinsäure ist der Grundbaustein des Hämins) hatte das Vermögen, die Nitrat-Reduktase zu inaktivieren, verloren.

In der vorliegenden Arbeit wurden hem$^-$ Mutanten von E. coli auf ihre Fähigkeit, die Citrat-Lyase zu inaktivieren, untersucht. Das Verhalten der beiden Cytochrom-negativen Mutanten war sehr interessant, wenn auch schwer interpretierbar. Die eine hatte die Fähigkeit, die Citrat-Lyase zu inaktivieren, vollständig verloren. Auch wenn die Cytochromsynthese durch Supplementierung mit 5-Aminolaevulinsäure ermöglicht wurde (in hem A$^-$ Mutanten ist der Biosyntheseweg zur 5-Aminolaevulinsäure geblockt), wurde die Fähigkeit zur Inaktivierung der Citrat-Lyase nicht restauriert. Verwirrend war das Verhalten der zweiten hem A$^-$ Mutante. Im anaeroben Ansatz wurde auch hier die Citrat-Lyase nicht inaktiviert, die aerobe Inaktivierung lief hingegen normal ab. Wurde in dieser Mutante die Cytochrom-Synthese durch Zugabe von 5-Aminolaevulinsäure zum Medium ermöglicht, kehrte sich das Bild um: Die aerobe Inaktivierung war gehemmt, die anaerobe restauriert. Es wird ersichtlich, daß die Cytochrome an der Kopplung zur Citrat-Lyase-Inaktivierung nicht direkt beteiligt sind. Vielmehr muß man annehmen, daß ein Faktor eine Rolle spielt, der in seiner Synthese oder Aktivierung vom Regulationssystem der Cytochrome abhängig ist.

Die Arbeiten von OHKI (OHKI, 1972; OHKI et al., 1974; 1975) vermitteln einen Eindruck vom verzweigten Regulationsnetzwerk, dem die einzelnen Faktoren der Membran unterworfen sind. Die Autoren fanden, daß die Synthese des Cytochrom b_1 sowie zweier Transportsysteme und zweier Enzyme unter dem Einfluß eines speziellen regulatorischen Proteins stehen. MAC GREGOR (1975; 1976) zeigte anhand des dissimilatorischen, membrangebundenen Nitrat-Reduktase-Komplexes eine starke gegenseitige Abhängigkeit der einzelnen Untereinheiten in Bezug auf ihre Synthese und ihren Einbau. Kann beispielsweise Cytochrom b_1 (ein Bestandteil der Nitrat-Reduktase) mutationsbedingt nicht mehr synthetisiert werden, so wird Nitrat-Reduktase-Protein im Überschuß gebildet und kann nur noch zum Teil in die

Membran integriert werden.

Mutation in einem Biosyntheseweg kann also Rückwirkungen auf andere Membranbestandteile haben. Restaurieren des Biosyntheseweges durch Supplementieren mit einer Substanz, die in der Sequenz hinter dem Mutationsblock liegt, kann nicht in jedem Fall auch das gestörte Regulationssystem wieder instand setzen. Als Indiz hierfür kann gelten, daß hem A^--Mutanten, wenn sie mit δ-Aminolaevulinsäure supplementiert werden, gegenüber dem Wildtyp einen stark erhöhten Cytochromgehalt haben (MAC GREGOR, 1975 und eigene Beobachtungen).

Eine faszinierende Leistung der Enterobakterien ist die Leichtigkeit, mit der sie sich an aerobes, anaerobes oder anaerobes Wachstum mit Nitrat oder Fumarat als Elektronenendacceptor adaptieren. Jedesmal sind tiefgreifende Änderungen im Stoffwechselgeschehen notwendig, die präzise aufeinander abgestimmt sein müssen. Mit den Übergängen zwischen anaerobem und aerobem Wachstum hat sich eine ganze Reihe von Arbeitsgruppen beschäftigt. Die Ergebnisse sind in einem Übersichtsartikel von HARRISON (1972) zusammengefaßt. Obwohl viele Details zusammengetragen wurden, ist kein allgemeines Regulationsprinzip abzuleiten. Trotzdem sollte man in der Zelle einen Regulator vermuten, der als zentrales Signal auslösend wirkt für tiefgreifende Umgestaltungen in der Zelle. Vergleichbare Regulatoren sind in E. coli das c-AMP für die Kontrolle der Synthese induzierbarer Enzyme (PASTAN und PERLMAN, 1970), der "magic spot" (Guanosin-3'diphosphat-5'diphosphat) als Wachstums-Modulator unter Mangelbedingungen (CASHEL, 1975) oder - auf etwas anderer Ebene - die Glutamin-Synthetase als Induktor und Repressor für die Enzyme des Glutamat- und Ammonium-Stoffwechsels (MAGASANIK et al., 1974).

Der hypothetische Regulator würde die Information darüber, daß in der Membran elektronentransportabhängige Phosphorylierung stattfindet, in das Cytoplasma tragen. Die Inaktivierung der Citrat-Lyase sollte einer der

Prozesse sein, der durch dieses Signal ausgelöst wird. Es muß vorerst offen bleiben, ob dieser hypothetische "messenger" direkt auf die Citrat-Lyase wirkt oder ob ein oder mehrere Regulationsproteine zwischengeschaltet sind.

Es muß betont werden, daß die Regulation der Citrat-Lyase in den Enterobakterien, wie sich in dieser Arbeit zeigte, nur auf Übergänge zwischen aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen abgestellt ist. Bei E. aerogenes führte die Unvollkommenheit der Regulation in bestimmten Stoffwechselsituationen (Übergang vom anaeroben Citrat auf anaerobes Glucose-Wachstum; anaerobes Wachstum auf Citrat plus Nitrat) zu massiven Wachstumsstörungen.

In den Chloroplasten der Pflanzen wurden einige Enzyme beschrieben, die einer Lichtaktivierung oder einer Lichthemmung unterworfen sind (Übersichtsartikel: KELLY et al., 1976). Gut untersucht ist die Fructose-Biphosphatase (BUCHANAN et al., 1971; BUCHANAN und SCHÜRMANN, 1973; ARNON und BUCHANAN, 1974). Dieses Enzym unterliegt einer kovalenten Modifikation und wird in Abhängigkeit vom Elektronentransport reguliert. Lichteinstrahlung bewirkt eine Aktivierung. Durch den resultierenden Umsatz des in der Photosynthese entstehenden Fructose-1,6-biphosphats erhöht sich der Fructose-6-phosphat pool. Dieses wird zum Teil als photosynthetisches Endprodukt abgezogen, der andere Teil fließt in den reduktiven Pentosephosphat-Cyclus zurück und dient der Regeneration des CO_2-Acceptors Ribulose-1,5-biphosphat. Daneben erfüllt Fructose-6-phosphat noch eine wichtige regulatorische Funktion: Es aktiviert das CO_2-fixierende Enzym, die Ribulose-1,5-biphosphat-Carboxylase. Über die dargestellte Sequenz treibt also das einfallende Licht in physiologisch sinnvoller Weise den Calvin-Cyclus an. Das regulatorische Schlüsselenzym ist demnach die Fructose-1,6-biphosphatase. Nach BUCHANAN ist die Aktivierung sehr direkt vom lichtgetriebenen Elektronentransport abhängig. Die Kopplung erfolgt über einen Elektronen-carrier: Photosynthetisch reduziertes Ferredoxin führt die Fructose-1,6-biphosphatase in die aktive Form über. Hierzu

ist ein weiteres, nicht näher charakterisiertes Protein notwendig. Als Mechanismus der Aktivierung vermuten die Autoren die reduktive Spaltung einer oder mehrerer Disulfidbrücken im Enzym.

Dieses System könnte modellhaften Charakter haben für eine Kopplung zwischen Elektronentransport und Enzymregulation durch kovalente Modifikation.

4. ZUSAMMENFASSUNG

1. Citrat-Lyase ist das erste Enzym des anaeroben Citratabbaus durch Enterobacter aerogenes. Es war bekannt, daß dieses Enzym in einer aktiven (acetylierten) und einer inaktiven (desacetylierten) Form vorliegen konnte und daß die Acetylgruppe durch Umesterung mit Citrat an der Reaktion teilnahm. Die in vitro als Seitenweg zu beobachtende Reaktionsinaktivierung (die Verseifung des intermediären Citryl-Enzyms zu dem inaktiven Desacetyl-Enzym) spielte in vivo - wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde - keine Rolle. Das bedeutet, daß in der Zelle die Citrat-Lyase vor Reaktionsinaktivierung geschützt war.

2. Citrat-Lyase ist ein direkter Antagonist der Citrat-Synthase und sollte deshalb einer besonders strikten Regulation unterworfen sein. Diese war in Enterobacter aerogenes auf die Übergänge zwischen aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen konzentriert. Aerobe Bedingungen führten physiologisch sinnvoll zur Inaktivierung (Desacetylierung). Anaerobe Bedingungen bewirkten nur eine Reaktivierung (Acetylierung), wenn Citrat vorhanden war.

3. Beim Übergang vom anaeroben Citrat- zum anaeroben Glucose-Wachstum wurde die Citrat-Lyase nicht inaktiviert. Das war ein schwacher Punkt der Regulation, da bei anaerobem Wachstum auf Glucose Citrat-Synthase-Aktivität für die Glutamat-Synthese benötigt wurde. Die Zellen gerieten in der Übergangsphase unter Glutamat-Mangel, der Wachstumsstörungen zur Folge hatte.

4. Inaktivierung der Citrat-Lyase trat immer dann ein, wenn Elektronentransport (in Enterobacter aerogenes mit Sauerstoff oder Nitrat, in Escherichia coli auch mit Fumarat als e^--Acceptoren) möglich war. Es wurde postuliert, daß die Inaktivierung der Citrat-Lyase eine direkte Folge von Elektronentransport- und/oder Phosphorylierungsvorgängen

in der Membran war.

5. Diese Vermutung wurde durch Versuche mit Hemmern und Entkopplern der Elektronentransportkette sowie durch Untersuchungen mit elektronentransport- und energiekopplungsgeschädigten Mutanten von Escherichia coli gestützt.

6. Die Kopplung der Inaktivierung an Elektronentransportvorgänge macht verständlich, daß das Citrat-Lyase-inaktivierende Prinzip in vitro nicht auffindbar war.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Bakterienstämme

Enterobacter (Klebsiella, Aerobacter) aerogenes NCIB 418

Escherichia coli K 12 Wildtyp DSM 498

Mutanten von E. coli K 12 (elektronentransport- oder energiekopplungsgeschädigt)

A 1004c	Ymel (λ), F^-, lac I^-, fad R^-, but 12^-, rha^-, ilv^-, met E^-, hem A^-
S 80	Ymel (λ), F^-, lac I^-, fad R^-, but 12^-, rha^-, ubi^- (ubi-Gen enthält thermoinduzierbaren Mu-Phagen; Wachstum unter 33° C)
DG 20/1	Ymel (λ), F^-, lac I^-, fad R^-, but 12^-, rha^-, unc A^-
DG 26/4	Ymel (λ), F^-, lac I^-, fad R^-, but 12^-, rha^-, unc B^-
BH 273	Ymel (λ), F^-, lac I^-, fad R^-, but 12^-, rha^-, unc A^-
AN 120	F^-, arg $E3^-$, thi^-, str^R, unc A^-
AN 99	met E^-, thi^-, men A^-
AN 385	ubi A^-
SASX 76	(früher SHSP 18) F^-, met^-, trp^-, lac^-, hem A^-
WGAS	F^-, gal^-, trp A , str^R (Elternstamm von WGAS frd 11)
WGAS frd 11	F^-, gal^-, trp A^-, str^R, frd^-

Die Stämme A 1004c, S 80, DG 20/1, DG 26/4 und BH 273 stammen von Dr. Schairer, Tübingen. DG 20/1, DG 26/4 und BH 273 sind bei SCHAIRER et al. (1976) beschrieben.

Die Stämme AN 120 (BUTLIN et al., 1971), AN 99 (NEWTON et al., 1971) und AN 385 stammen von Dr. Gibson und Dr. Young, Canberra, Australien.

Der Stamm SASX 76 (SHSP 18) (SASARMAN et al., 1968; SINGH und BRAGG, 1975) stammen von Dr. Singh, Vancouver, Canada.

Die Stämme WGAS und WGAS frd 11 stammen von Dr. Guest, Sheffield, England (SPENCER und GUEST, 1973; LAMBDEN und GUEST, 1976; MACY et al., 1976).

Die in diesem Zusammenhang bedeutenden Symbole hem, ubi, men, unc und frd sind im Text Kapitel 2.2.2. erläutert. Die anderen genetischen Symbole sind bei BACHMANN et al. (1976) erfaßt.

5.2. Nährmedien

5.2.1. Medien für die "batch"-Kultur von E. aerogenes

Citrat-Medium (DAGLEY, 1954):

KH_2PO_4, 5 g; $(NH_4)_2SO_4$, 2 g; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 2 g; Na_3-Citrat $\cdot$ 2 H_2O, 10 g; SL 4 (10 : 1), 0,1 ml; mit 5 N NaOH auf pH 7; mit aq. dest. auf 1 l.

Glucose-Medium:

Wie das Citrat-Medium, aber anstelle von Citrat 7,2 g/l Glucose und weniger Magnesium (0,4 g/l).

In einem Versuch wurde die Glucose durch 4,5 g/l D,L-Lactat bzw. 3 ml/l Glycerin ersetzt.

Die Succinat-Agarplatten enthielten anstelle von Glucose 10 g Succinat/l und 2 % Agar.

Wenn angegeben waren zusätzlich 3,4 g KNO_3/l im Medium.

5.2.2. Medien für die kontinuierliche Kultur von E. aerogenes

Hier wurde ein Medium nach O'BRIEN und STERN (1969) (modifiziert) verwendet:

KH_2PO_4, 2 g; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0,4 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1 g; Citronensäure, 2,7 g; NaCl, 5,84 g; KCl, 6,52 g; $CaCl_2$ (1 M) 0,1 ml; SL 4 (10 : 1), 0,1 ml; mit 5 N KOH auf pH 7 (wenn nicht anders angegeben); mit aq. dest. auf 1 l.

Veränderungen dieses Grundmediums sind in den Versuchsbeschreibungen vermerkt (s. auch 5.5.1.). Bei Verschiebung der Citrat-Konzentration änderte sich auch die Menge KOH, die zur Neutralisation der Citronensäure notwendig war. Die K^+-Konzentration im Medium wurde dann durch Variation der KCl-Menge konstant gehalten. Nach O'BRIEN und STERN (1969) könnte sowohl die Na^+- als auch die K^+-Konzentration einen Einfluß auf die Enzymaktivitäten haben. Das angegebene Medium war 0,1 M an Na^+ (diese Konzentration ermöglicht nach O'BRIEN und STERN (1969) gutes anaerobes Wachstum) und 0,16 M an K^+ (bei derart hoher K^+-Konzentration ergeben sich nach O'BRIEN und STERN (1969) zum Teil erhöhte Enzymspiegel).

Die Spurenelementlösung SL 4 entsprach den Angaben von PFENNIG und LIPPERT (1966) und war 10 : 1 konzentriert.

5.2.3. Citrat-Glucose-Pepton-Medium für E. coli (DAGLEY, 1954):

KH_2PO_4, 9 g; Pepton, 5,6 g; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 2 g; Na_3-Citrat $\cdot 2\ H_2O$, 5 g; Glucose, 1 g; mit 5 N NaOH auf pH 7; mit aq. dest. auf 1 l.

In einigen Versuchen wurde Pepton durch vitaminfreie Casaminosäuren ersetzt. Änderungen in der Citrat- und Glucose-Konzentration sind in den Versuchsbeschreibungen vermerkt.

Das Medium zur anaeroben Inkubation von E. coli (anaerobe Citrat-Lyase-Inaktivierung) enthielt keine Glucose. Für den aeroben Citrat-Lyase-Inaktivierungstest mit E. coli enthielt das Medium kein Citrat und 10 g/l Glucose.

Die Medien für die auxotrophen E. coli-Mutanten wurden supplementiert. Aminosäuren waren in der Konzentration 10 mg/l, Thiamin mit 70 µg/l vorhanden. Das Wachstum der men$^-$-Mutante wurde mit Uracil (4 mg/l) unterstützt (NEWTON et al., 1971). δ-Aminolaevulinsäure oder Hämin wurde zugegeben wie in den Versuchsbeschreibungen angegeben.

Die Medien für die kontinuierliche Kultur wurden sterilfiltriert (Seitz-Filter), die anderen Medien wurden autoklaviert. Glucose wurde separat autoklaviert. Die Supplement-Faktoren für die E. coli-Mutanten wurden sterilfiltriert (Membran-Filter, Sartorius).

5.3. Anzucht der Zellen

Die Stämme wurden in Nutrient-Schrägagar-Röhrchen aufbewahrt und einmal im Monat überimpft.

Die Vorkulturen wurden im jeweils gewünschten Medium in Reagenzgläsern angezogen, die durch Wright-Burry-Verschlüsse anaerob gehalten wurden. Die Hauptkulturen wurden fünfprozentig beimpft.

5.3.1. Anaerobe Kultur

Die Medien wurden nach dem Autoklavieren heiß in sterile Meßkolben abgefüllt und luftdicht verschlossen. Nach dem Beimpfen wurden die Kolben mit Wright-Burry-Verschlüssen versehen.

5.3.2. Aerobe Kultur

Die Kulturen wurden unter intensiver Belüftung im Kluyver -Kolben (2 l) gezogen.

5.3.3. Kontinuierliche Kultur

Die Basis der Anlage war ein Biostat-Fermenter (5 l-Gefäß) der Firma Braun/Melsungen mit Meß-Regel- und Registriereinrichtung. Aufbau und Funktion gehen aus Abb. 18 hervor. Die Theorie der kontinuierlichen Kultur ist bei HERBERT et al. (1956) dargestellt. Die Durchflußrate (= Wachstumsrate) wurde bei 0,196 Std^{-1} gehalten. Nach jeweils 24 Stunden kontinuierlichen Wachstums wurde angenommen, daß sich die Kultur im "steady state" befindet (Nach dieser Zeit war das Kulturvolumen zu 99 % ersetzt).

In einigen Versuchen wurde auf Ausscheidungsprodukte geprüft. Um auch flüchtige Bestandteile zu erfassen, wurde die Anlage wie folgt modifiziert: Die Kulturflüssigkeit wurde über den Überlauf mit einer Peristaltik-Pumpe abgezogen, das Gas verließ den Fermenter über einen Abgaskühler (Firma Braun/Melsungen), der bei 2° C gehalten wurde. Anschließend wurde das Abgas durch eine Kühlfalle (Trockeneis) geführt. Hier konnten jedoch keines der Ausscheidungsprodukte gefunden werden.

5.3.4. Wachstumskontrolle

Das Wachstum der Kulturen wurde durch Trübungsmessung verfolgt. Nach geeigneter Verdünnung wurde die Trübung (optische Dichte) im Photometer (Zeiss PM 4) bei 500 nm gegen Nährlösung gemessen (1 cm-Küvetten). Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte nach der Tiegelmethode.

Die Reinheitskontrolle der Kulturen erfolgte durch Mikroskopie sowie durch Ausstrich auf Nutrient- sowie Eosin-Methylenblau-Lactose-Agarplatten.

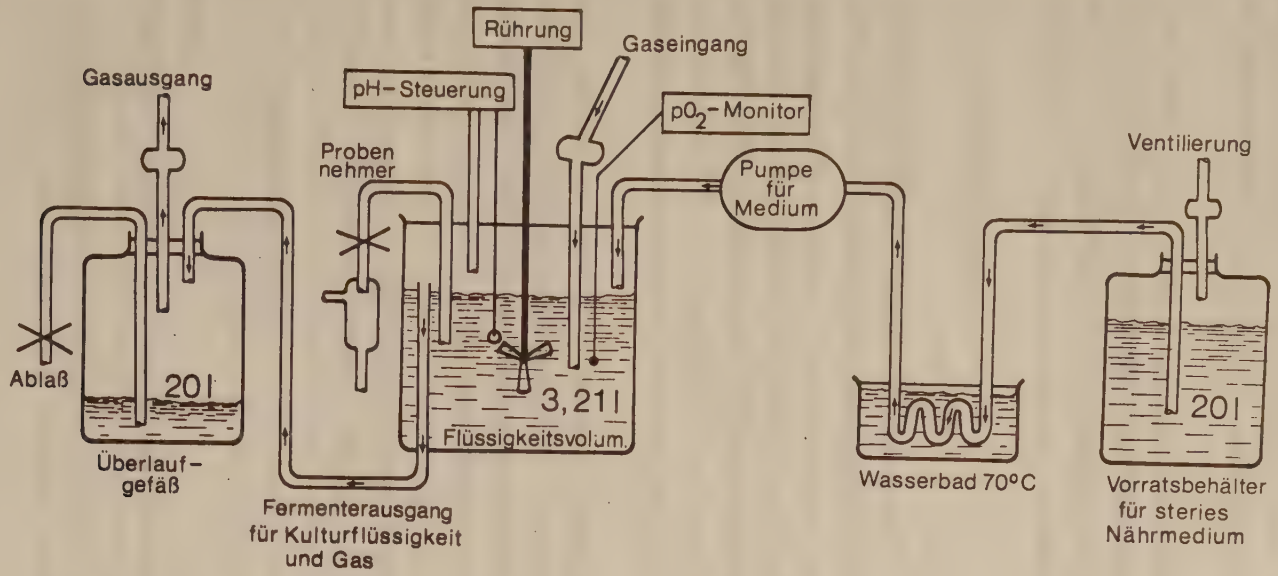


Abb. 18 Aufbau der kontinuierlichen Kultur

Temperatur: 30° C
Rührung: 600 U/Min.
pH: pH 7,0 wenn nicht anders angegeben. Autotitration mit 2,5 N Phosphorsäure und 1,6 N KOH.
Gasdurchfluß: Für aerobes Wachstum: 5 l Luft/Min.
Für anaerobes Wachstum: 1/2 l Stickstoff/Min. (nach Umschalten von aerob auf anaerob für 15 Min. 5 l N_2/Min.)

Das 70° C Wasserbad sollte das Zurückwachsen der Zellen in das Vorratsgefäß verhindern.

Nach Ende des Wachstums wurden die Mutanten (mit Ausnahme der men$^-$- und frd$^-$-Mutanten) durch Ausstrich auf Succinat-Agarplatten (supplementiert mit den entsprechenden Aminosäuren bzw. Thiamin) auf Revertanten geprüft. In allen Fällen kamen keine oder nur vereinzelte Kolonien zum Wachstum. men$^-$- und frd$^-$-Mutanten können auf Succinat wachsen. Sie wurden nicht auf Reversion geprüft. Ihre stark vom Wildtyp abweichenden Eigenschaften, wie sie in Kapitel 2.2.2. aufgezeigt werden, waren Bestätigungen dafür, daß sich im Wachstum keine Revertante durchsetzen konnte.

5.3.5. Wachstumsversuche mit E. aerogenes

Die Versuche wurden in Reagenzgläsern mit 10 ml Medium durchgeführt, die durch Wright-Burry-Verschlüsse anaerob gehalten wurden. Beimpft wurde fünfprozentig aus einer Vorkultur, die anaerob mit Citrat gewachsen war. Die Messung der optischen Dichte der Kulturen wurde bei 500 nm (Bausch & Lomb, Spectronic 20) direkt in den Reagenzgläsern durchgeführt. Da Verdünnen nicht möglich war, wurden die Werte mit einer zuvor erstellten Eichkurve korrigiert.

Die Inkubationstemperatur war in allen Versuchen 30° C.

5.4. Probenentnahme und Ernte

Zellfreier Überstand wurde durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 10 Min. 4 000 U/Min.) von 5 ml Kulturflüssigkeit erhalten. Bis zur Bestimmung der Substrate und Produkte wurde der Überstand eingefroren.

Zur Enzymaktivitäts-Bestimmung wurde den Kulturen 200 bis 500 ml Probe entnommen, sofort mit 10 % Eis versetzt und im Kühlschrank bei 4° C bis zur Ernte nicht länger als 3 Stunden aufbewahrt (Auch bei Versuchen in der kontinuierlichen Kultur wurden die Proben direkt dem Fermenter entnommen).

Die Zellen wurden durch 20minütige Zentrifugation bei 6 000 U/Min. (Christ Zeta 20, 500 ml-Becher, 5° C) abgeerntet, zweimal mit kaltem Puffer (0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7) gewaschen, dann in wenig Puffer aufgenommen und eingefroren.

5.5. Wachstumsumschaltversuche

5.5.1. In der kontinuierlichen Kultur mit E. aerogenes

Hier wurden die Umschaltversuche (shift-Versuche) mit der stetig wachsenden Kultur vorgenommen, ohne daß eine Wachstumsunterbrechung notwendig war. Die Übergänge zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen wurden durch Gaswechsel erreicht wie in der Legende zu Abb. 18 beschrieben. Die Bedingungen (aerob, anaerob) hatten sich in wenigen Minuten eingestellt, wie die Anzeige der O_2-Konzentration zeigte.

Im oben angegebenen Medium (5.2.2.) ist das Wachstum durch die C- und Energiequelle Citrat begrenzt. Das erwies sich für die Prüfung der Ausscheidungsprodukte als günstig, da hier immer die gleiche Menge Substrat durchgesetzt wurde. Für die Versuche zur Enzymregulation war es besser, das Wachstum durch die Stickstoffquelle zu limitieren, da hier die induzierenden Effekte des in hoher Konzentration vorliegenden Citrats oder der Glucose auf die interessierenden Enzyme stärker zur Wirkung kamen (KULLA, 1973). In zwei Versuchen wurde durch Sulfat-Mangel begrenzt. Das $(NH_4)_2SO_4$ wurde hier durch NH_4Cl ersetzt und die benötigte Menge Sulfat als Na_2SO_4 zugegeben.

In einigen Versuchen wurde ein Substrat-Wechsel während des kontinuierlichen Wachstums vorgenommen. Die Kultur stand dabei unter Ammonium- (in einem Fall Sulfat-) Mangel. Die C- und Energiequelle (Citrat oder Glucose) war im einfließenden Medium so eingewogen, daß die Konzentration, die sich in der Kultur einstellte, bei 1 mM lag und nach dem Umschalten sehr

schnell vollständig aufgebraucht war. Ab dem Zeitpunkt des Umschaltens floß das neue Medium in die Kultur. Die Konzentration der neuen C- und Energiequelle in der Kultur würde sich von Null beginnend nur langsam dem neuen "steady state" nähern. Um einen abrupten Übergang zu erreichen, wurde zum Zeitpunkt des Umschaltens eine entsprechende Menge der C- und Energiequelle direkt in die Kultur gespritzt.

Die interessierenden Konzentrationen im Medium sowie die resultierenden Wachstumsbegrenzungs-Bedingungen sind jeweils bei den Versuchen angegeben.

5.5.2. In vivo-Versuche zur Inaktivierung der Citrat-Lyase (diskontinuierlich)

5.5.2.1. mit E. aerogenes

Die Zellen wuchsen 12 Stunden anaerob im Citrat-Medium. Zu dieser Zeit war die Kultur in der frühen stationären Phase. Es wurde eine Probe zur Enzymaktivitäts-Bestimmung entnommen. Die Citrat-Lyase lag zu 90 bis 100 % aktiv vor. Die Kultur wurde sodann in 200 ml-Portionen aufgeteilt und mit 10 % Eis versetzt. Es wurde abzentrifugiert und die sedimentierten Zellen in jeweils 200 ml Glucose-Medium aufgenommen und bei 30° C aerob in 2 l-Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen auf der Schüttelmaschine (150 U/Min.) für 1 Stunde inkubiert. Danach kamen die Kulturen wieder auf Eis und wurden zur Enzymaktivitäts-Bestimmung aufgearbeitet. Nach dieser Inkubation lag noch 10 bis 25 % der Citrat-Lyase aktiv vor.

Dieser Ansatz wurde verwendet, um die Wirkung verschiedener Inhibitoren und Effektoren auf die Citrat-Lyase-Inaktivierung zu testen. Die zu prüfenden Substanzen waren im Inkubationsmedium (Glucose-Medium aerob) gelöst. Die Protein-, RNS- und DNS-Synthesehemmer wurden außerdem sofort nach Entnahme aus der anaeroben Citrat-Kultur zugegeben.

Voll reproduzierbar war die Inaktivierungsrate nur für Ansätze, die aus ein und derselben Citrat-Kultur stammten. Deswegen wurde, wie oben gesagt, jede Kultur vor der aeroben Inkubation aufgeteilt. Einer der Teile wurde jeweils nicht mit Effektoren versehen und diente als Kontrolle. Die Inaktivierung der Citrat-Lyase, die in diesem Ansatz erzielt wurde, wurde als 0 %, das Ausbleiben einer Inaktivierung als 100 % Hemmung definiert. Die Inaktivierungen, die die parallelen Ansätzen mit den Effektoren erzielten, wurden in diese Spanne eingeordnet und so als Prozent Hemmung der Citrat-Lyase-Inaktivierung eingetragen.

5.5.2.2. mit E. coli und den E. coli-Mutanten

Prinzipiell wurden diese Messungen genauso vorgenommen wie für E. aerogenes beschrieben. Verwendet wurden die unter 5.2.3. aufgeführten Medien. Für die anaerobe Inaktivierung wurde der Test wie folgt modifiziert: Die anaerobe Citrat-Glucose-Pepton-Kultur wurde unter starker N_2-Begasung in die fest verschließbaren Stahl-Zentrifugenbecher abgefüllt. Nach der Zentrifugation wurde wiederum unter Begasung der Überstand dekantiert und die sedimentierten Zellen im Inkubationsmedium, das zuvor durch einstündiges Begasen mit N_2 anaerob gemacht wurde, suspendiert. Die Becher wurden verschlossen und eine Stunde bei 30° C und leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Becher im Eisbad abgekühlt, dann wurden die Zellen zum Enzymaktivitäts-Test aufgearbeitet.

Wenn es nicht möglich war, die Inaktivierungsrate auf einen Kontrollansatz zu beziehen (wie unter 5.5.2.1. beschrieben), wurden die Inaktivierungsfaktoren angegeben. Das ist die Citrat-Lyase-Aktivität nach Acetylierung geteilt durch die Aktivität, die ohne Acetylierung erreicht wurde.

5.6. Zellaufschluß

Im Standardverfahren wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen. 3 bis 8 ml Zellsuspension wurden 10 mal für 30 Sekunden beschallt (MSE Ultrasonic Desintegrator); zwischen jedem Intervall waren 30 Sek. Pause. Gekühlt wurde im Eisbad.

Aufschluß mit der French-Presse: Mit einem Druck von 80 kp/cm^2 wurde die Zellsuspension zweimal durch die Öffnung der vorgekühlten French-Presse (Aminco, USA) gedrückt. Der Extrakt tropfte in ein im Eisbad gekühltes Reagenzglas.

Lysozymaufschluß: 2,5 ml Zellsuspension im Tris-Puffer (50 mM, pH 8)
0,5 ml Lysozym-Lösung (0,05 mg/ml)
wenig Desoxyribonuclease (ca. 0,1 mg/ml)
Nach 2 Min. 0,1 ml Äthylendiamintetraessigsäure-Lösung (0,8 mg/ml) dazu,1 Stunde bei 30° C inkubieren.

Die Vesikelpreparation wurde nach JOHNSON et al. (1975) vorgenommen. Ganz gebliebene Zellen wurden abzentrifugiert, die Vesikel dialysiert (s. unten).

5.7. Weitere Behandlung der Extrakte

Herstellung von Rohextrakt: Intakt gebliebene Zellen und Zelltrümmer wurden 20 Min. bei 15 000 g abzentrifugiert (Christ Zeta 20; Rotor 32 x 12; 4° C).

Die hochtourige Zentrifugation (100 000 g) wurde in der Christ-Vacufuge (Rotor 8 x 12) durchgeführt.

Herstellung von membranhaltigem Rohextrakt: Intakt gebliebene Zellen wur-

den 30 Min. bei 900 g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgehebert.

Dialyse: Die Extrakte wurden 2 x 6 Stunden gegen 3 l Puffer (0,1 M Kaliumphosphat, pH 7; 1 mM $MgCl_2$; 0,5 mM Dithioerythrit) dialysiert (Dialyse-Schläuche der Firma Union Carbide, USA). Die Citrat-Lyase wurde durch Versetzen mit 1,75 mM Acetanhydrid reacetyliert.

Fraktionierung von Rohextrakt wurde durch Chromatographie an DEAE-Cellulose DE 52 nach der Methode von DAGLEY (1969) durchgeführt. Alle proteinhaltigen Fraktionen wurden auf Citrat-Lyase-Desacetylierungsaktivität geprüft wie unter 5.9 angegeben.

Einige Rohextrakte wurden durch Chromatographie an Sephadex G 25 (1,5 x 10 cm) von niedermolekularen Bestandteilen gereinigt.

Wenn notwendig, wurden die Extrakte in einer Ultrafiltrationskammer (Amicon, USA; Filter PM 10) eingeengt.

5.8. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von LOWRY et al. (1951) durchgeführt. Die Eichkurven wurden mit Rinderserumalbumin aufgenommen.

5.9. Ansatz zur Messung der in vitro-Inaktivierung (Desacetylierung) der Citrat-Lyase:

0,05 ml Citrat-Lyase-Lösung oder Puffer
0,4 ml Zellextrakt unterschiedlicher Herkunft und Aufarbeitung (5 bis 7 mg Protein/ml)
0,05 ml Puffer oder Effektor

Der 0,1 M Kaliumphosphat- oder 16 mM Tris-HCl-Puffer war auf pH 7 eingestellt.

Käufliche (aus E. aerogenes gewonnene) Citrat-Lyase wurde hinzugegeben, wenn die Extrakte keine oder zuwenig Citrat-Lyase-Aktivität enthielten. Der Ansatz sollte immer 2 bis 4 E/ml enthalten.

In Stundenintervallen wurden Proben genommen und die Citrat-Lyase-Aktivität vor und nach Acetylierung bestimmt. Das Verhältnis von Aktivität nach Acetylierung zu der vor Acetylierung gab das Maß für die Inaktivierung (Desacetylierung) und wird als Inaktivierungsfaktor bezeichnet. Der Aktivitätsverlust in Folge unspezifischer Denaturierung lag zwischen 10 und 20 % pro Stunde.

Das angegebene Grundschema für den Inaktivierungsansatz wurde heuristisch in einer großen Anzahl von Versuchen modifiziert, immer mit dem Ziel, eine Stimulierung der in vitro-Inaktivierungsrate zu erreichen. Näheres hierzu unter 2.1.6.

5.10. Bestimmung von Substraten und Produkten

Enzymatisch-photometrisch wurden bestimmt wie bei BERGMEYER (1974) angegeben:

Citrat mit Citrat-Lyase
Acetat mit Acetat-Kinase und Hydroxylamin
Äthanol mit Alkohol-Dehydrogenase und NAD
Glutamat mit Glutamat-Dehydrogenase und 3-Acetylpyridinadenindinucleotid (NAD-Analoges)
α-Ketoglutarat mit Glutamat-Dehydrogenase

Glucose- und Ammonium-Bestimmungen wurden mit "Biochemica-Test-Com-

binationen" der Firma Boehringer/Mannheim durchgeführt (Glucose: Blutzucker-Test "GOD-Perid-Methode"; Ammonium mit dem Harnstoff-Test).

Lactat, Pyruvat, Succinat, Fumarat und Malat wurden durch Chromatographie qualitativ nach GOEBELL und KLINGENBERG (1963) nachgewiesen (Zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie an Cellulose; 1. Fließmittel: Äthanol + Ammoniak (25 %ig) + Wasser (72,6 + 18,2 + 9,2); 2. Fließmittel: Isobutanol + 5 M Ameisensäure (40 + 60).

Acetoin und Diacetyl wurden qualitativ in der Voges-Proskauer-Reaktion nachgewiesen (5 ml Kulturüberstand + 5 ml 40 % KOH + ca. 50 mg Kreatin). 2,3-Butandiol wurde qualitativ nach NEISH (1952) bestimmt (Oxidation des Butandiols mit Perjodat zu Acetaldehyd, Anfärben mit Nitroprussid).

5.10.1. Bestimmung von Formiat mit der Formyl-THF-Synthetase

Die Methode stammt von RABINOWITZ und PRICER (1957) und wurde von ANDREESEN (persönliche Mitteilung) modifiziert. Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der enzymkatalysierten Bildung von 10-Formyl-THF aus Formiat und THF (ATP-abhängige Reaktion). Im Sauren lagert sich das Produkt zu 5,10-Methenyl-THF um, das bei 350 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von 24,9 $cm^2\ \mu M^{-1}$ absorbiert.

Testvolumen: 0,75 ml; Konzentrationen im Test: Triäthanolamin-HCl-Puffer, pH 8, 113 mM; Mercaptoäthanol, 187 mM; $MgCl_2$, 10 mM; ATP, 5 mM; THF, 0,4 mM; NH_4Cl, 6,7 mM; Formiat, maximal 0,3 mM; Formyl-THF-Synthetase, 13 E/ml.

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Formyl-THF-Synthetase gestartet.

Das Enzym wurde von ANDREESEN aus Clostridium formicoaceticum 10fach angereichert (82 E/mg Protein).

Der Ansatz wurde bei 37° C inkubiert. Nach 20 und 30 Min. wurden 200 µl Aliquots entnommen und in 0,6 ml 0,36 N HCl abgestoppt. Nach 10 Min. wurde die Extinktion bei 350 nm gegen einen Leerwert ohne Enzym gemessen. Die Formiat-Konzentration in der Probe wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungen mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt.

5.11. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Messungen wurden in einem Zeiss-Photometer PM 4 mit TE-Wandler und Schreiber ausgeführt. Die Küvetten (1 cm Lichtweg) waren auf 25° C temperiert. Die Enzymaktivität ergab sich aus dem ΔEx/Min. nach Abzug der Blindreaktion.

5.11.1. Citrat-Lyase nach MOELLERING und GRUBER (1966), modifiziert

Testvolumen 3 ml; Konzentrationen im Test: Kaliumphosphat-Puffer, 0,1 M, pH 7,6; $ZnCl_2$, 0,5 mM; NADH, 0,21 mM; Malat-Dehydrogenase, 6 E/ml; Lactat-Dehydrogenase, 6 E/ml; Na_3-Citrat, 1,7 mM und Extrakt; Meßstrahlung: 365 nm.

Gestartet wurde durch Einmischen des Citrats.

Mit diesem Ansatz wurde nur die Aktivität der aktiv (acetyliert) vorliegenden Citrat-Lyase erfaßt. Sollte die Aktivität der Gesamt-Citrat-Lyase (aktiv + inaktiv) erfaßt werden, so wurde vor Start der Reaktion direkt in der Küvette mit Acetanhydrid acetyliert (BUCKEL et al., 1971; BEUSCHER et al., 1974). Das Acetanhydrid wurde 1 : 10 mit eiskaltem Wasser verdünnt und 5 µl sofort in den Testansatz gemischt (Endkonzentration 1,75 mM). Bereits nach wenigen Sekunden ist die Acetylierung vollendet und das Acetanhydrid zersetzt (BUCKEL et al., 1971). Durch die denaturierende Wirkung des starken Acetylierungsmittels gingen 20 % Enzymaktivität verloren (KULLA, 1973).

Die Acetylierung der Citrat-Lyase mit Acetanhydrid war gut reproduzierbar. Wahrscheinlich hat das aktive Zentrum des Enzyms eine hohe Affinität zur Anhydridstruktur, da ein gemischtes Säureanhydrid (Acetyl-Citryl) als Zwischenprodukt der Umacetylierung am Enzym entstehen soll (BUCKEL, 1976).

5.11.2. Citrat-Synthase (FALOONA und SRERE, 1969)

1 ml Testvolumen; Konzentration im Test: Tris-HCl-Puffer, pH 8, 50 mM; 5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoat, 1 mM; KCl, 0,1 M; Oxalacetat, 0,5 mM; Acetyl-CoA, 0,3 mM und Extrakt. Wenn keine Extinktionsänderung mehr feststellbar war, wurde durch Oxalacetat-Zugabe gestartet.

Meßstrahlung: 412 nm (Extinktionskoeffizient: $\varepsilon = 13{,}6\ cm^2 \cdot \mu Mol^{-1}$).

5.11.3. Malat-Dehydrogenase

3 ml Testvolumen; Konzentration im Test: Kaliumphosphat-Puffer, pH 7, 0,1 M; NADH, 0,21 mM; Oxalacetat, 0,5 mM und Extrakt. Gestartet wurde durch Oxalacetat. Meßstrahlung: 365 nm.

5.11.4. "NADH-Oxidase"

Testansatz wie unter 5.11.3. beschrieben aber ohne Oxalacetat. Gestartet wurde durch Extrakt.

5.12. Synthesen

Acetyl-CoA und Succinyl-CoA wurde nach der Methode von SIMON und SHEMIN (1953) hergestellt.

Tetrahydrofolsäure (THF) wurde durch platinkatalysierte Reduktion von

Folsäure mit Wasserstoff erhalten (JONES et al., 1961).

5.13. Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien stammten von der Firma Merck/Darmstadt und hatten den Reinheitsgrad "p. a". Für die Nährlösungen wurde "reinst" verwendet. Die Lösungsmittel stammten von der Firma Baker/Groß Gerau. Enzyme und Biochemikalien wurden von der Firma Boehringer Mannheim GmbH/ Mannheim bezogen.

Außerdem wurden verwendet: Chloramphenicol, Amytal, 5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoat, Benzylviologen, Methylviologen und Rinderserumalbumin von der Firma Serva/Heidelberg; HQNO, Phenazinmethosulfat und S-Adenosyl-methionin von der Firma Sigma/St. Louis, USA; DNP, NEM und Dichlor-phenolindophenol vom British Drug House; CCCP von der Firma Calbio-chem/Los Angeles, USA; "nutrient broth", Pepton, Casaminosäuren und Agar von der Firma Difco/Detroit, USA; Eosin-Methylenblau-Lactose-Agar von der Firma Oxoid/London; DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher DE 52 von der Firma Whatman/England; Sephadex G 25 von der Firma Pharmacia/Uppsala, Schweden. Die Cellulose-Filter stammten von der Firma Sartorius/Göttingen.

TCS war ein Geschenk von Dr. Harold/Denver, USA.

Formyl-THF-Synthetase wurde freundlicherweise von Dr. Andreesen (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Der Stickstoff stammte von der Firma Messer-Griesheim/Kassel und hatte den Reinheitsgrad "Zweiring".

VI. LITERATURVERZEICHNIS

ABOUD, M.
BURGER, M.
1972
The effect of anaerobiosis and uncouplers on the stimulation of ß-galactosidase synthesis by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in E. coli.
J. Gen. Microbiol. 71, 311 - 318

ADLER, S. P.
PURICH, D.
STADTMAN, E. R.
1975
Cascade control of E. coli glutamine synthetase. Properties of the P_{II} regulatory protein and the uridylyl-transferase-uridylyl-removing enzyme.
J. Biol. Chem 250, 6264 - 6272

ALTENDORF, K.
HAROLD, F. M.
SIMONI, R. D.
1974
Impairment and restoration of the energized state in membrane vesicles of a mutant of E. coli lacking adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 249, 4587 - 4593

AMARASINGHAM, C. R.
DAVIS, B. D.
1965
Regulation of α-ketoglutarate dehydrogenase formation in E. coli.
J. Biol. Chem. 240, 3664 - 3668

ARIMA, K.
WATANABE, K.
BEPPU, T.
1972
Isolation of the citrate transport-enhancing factors from Aerobacter cloacae.
Agr. Biol. Chem. 36, 2105 - 2112

ARNON, D. I.
BUCHANAN, B. B.
1974
Ferredoxins and photosynthesis. In: Horizons in Biochemistry and Biophysics, Vol. 1 (E. Quagliaviello, ed.), S. 303 - 344, Addison-Wesley Publishing Co.

BACHMANN, B.
LOW, K. B.
TAYLOR, A. L.
1976
Recalibrated linkage map of E. coli K 12.
Bacteriol. Rev. 40, 116 - 167

BARMAN, T. E.
1969
Enzyme Handbook.
Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York

VAN DER BEEK, E. G. 1976 Oxidative phosphorylation and electron transport in Proteus mirabilis. Diss. Amsterdam

BERGMEYER, H. U. 1974 Methoden der enzymatischen Analyse. 3. Auflage; Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

BISSCHOP, A.
DODDEMA, H.
KONINGS, W. N. 1975 Dicarboxylic acid transport in membrane vesicles from Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 124, 613 - 622

BEUSCHER, N.
MAYER, F.
GOTTSCHALK, G. 1974 Citrate lyase from Rhodopseudomonas gelatinosa: Purification, electron microscopy and subunit structure. Arch. Microbiol. 100, 307 - 328

BOONSTRA, J.
HUTTUNEN, M. T.
KONINGS, W. N.
KABACK, H. R. 1975 Anaerobic transport in E. coli membrane vesicles. J. Biol. Chem. 250, 6792 - 6798

BOWEN, I.
MORTIMER, M. 1971 Sub-units of citrate oxalacetate lyase. Eur. J. Biochem. 23, 262 - 266

BOYER, P. D. 1975 A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport. FEBS Letters 58, 1 - 6

BREWER, C. R.
WERKMAN, C. H. 1939 The anaerobic dissimilation of citric acid by Aerobacter indologenes. Enzymologia 6, 273 - 281

BUCHANAN, B. B.
SCHÜRMANN, P. 1973 Regulation of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase in the photosynthetic assimilation of carbon dioxyde. J. Biol. Chem. 248, 4956 - 4964

BUCHANAN, B. B.
SCHÜRMANN, P.
KALBERER, P. P. 1971 Ferredoxin-activated fructose diphosphate of spinach chloroplasts. J. Biol. Chem. 246, 5952 - 5959

BUCKEL, W. 1976 Acetic anhydride: an intermediate analogue in the acyl-exchange reaction of citramalate lyase. Eur. J. Biochem. 64, 263 - 267

BUCKEL, W.
BOBI, A. 1976 The enzyme complex citramalate lyase from Clostridium tetanomorphum. Eur. J. Biochem. 64, 255 - 262

BUCKEL, W.
BUSCHMEIER, V.
EGGERER, H. 1971 Der Wirkungsmechanismus der Citrat-Lyase aus K. aerogenes. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1195 - 1205

BUTLIN, J. D.
COX, G. B.
GIBSON, F. 1971 Oxidative phosphorylation in E. coli K 12. Mutations affecting magnesium ion-stimulated adenosine triphosphatase. Biochem. J. 124, 75 - 81

BUTLIN, J. D.
COX, G. B.
GIBSON, F. 1973 Oxidative phosphorylation in E. coli K 12: The genetic and biochemical characterization of a strain carrying a mutation in the unc B gene. Biochim. Biophys. Acta 292, 366 - 375

CAMPBELL, J. J. R.
GUNSALUS, I. C. 1944 Citric acid fermentation by Streptococci and Lactobacilli. J. Bacteriol. 48, 71 - 76

CARPENTER, D. E.
SINGH, M.
RICHARDS, E. G.
SRERE, P. A. 1975 On the molecular weights of the three nonidentical subunits of citrate lyase from Klebsiella aerogenes. J. Biol. Chem. 250, 3254 - 3260

CASHEL, M. 1975 Regulation of bacterial ppGpp and pppGpp. Ann. Rev. Microbiol. 29, 301 - 318

CAVARI, B. Z.
AVI-DOR, Y.
GROSSOWICZ, N. 1967 Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on respiration and respiration-dependent phosphorylation in E. coli. Biochem. J. 103, 601 - 608

COBLEY, J. G.
GROSSMAN, S.
SINGER, T. P.
BEINERT, H.
1975 Piericidin a sensitivity, site 1 phosphorylation, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase during iron-limited growth of Candida utilis.
J. Biol. Chem. 250, 211 - 217

COX, G. B.
GIBSON, F.
1974 Studies on electron transport and energy-linked reactions using mutants of E. coli.
Biochim. Biophys. Acta 346, 1 - 25

COX, G. B.
GIBSON, F.
PITTARD, J.
1968 Mutant strains of E. coli K-12 unable to form ubiquinone.
J. Bacteriol. 95, 1591 - 1598

COX, G. B.
NEWTON, N. A.
BUTLIN, J. D.
GIBSON, F.
1971 The energy-linked transhydrogenase reaction in respiratory mutants of E. coli K 12.
Biochem. J. 125, 489 - 493

CRANE, R. K.
LIPMANN, F.
1953 The effect of arsenate on aerobic phosphorylation.
J. Biol. Chem. 201, 235 - 243

CUNARRO, J.
WEINER, M. W.
1975 Mechanism of action of agents which uncouple oxidative phosphorylation: Direct correlation between proton-carrying and respiratory-releasing properties using rat liver mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta 387, 234 - 240

DAGLEY, S.
1954 Dissimilation of citric acid by A. aerogenes and E. coli.
J. Gen. Microbiol. 11, 218 - 227

DAGLEY, S.
1969 Citrate lyase. In: Methods in Enzymology XIII (J. M. Lowenstein, ed.), 160 - 163; Academic Press Inc., New York

DALL-LARSEN, T.
KRYVI, H.
KLUNGSØYR, L.
1976 Dinitrophenol, dicoumarol and pentachlorophenol as inhibitors and parasite substrates in the ATP phosphoribosyltransferase reaction.
Eur. J. Biochem. 66, 443 - 446

DECKER, K.
1959 Die aktivierte Essigsäure: Das Coenzym A und seine Acylderivate im Stoffwechsel der Zelle.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

DEFFNER, M.
FRANKE, W.
1939 Der Abbau der Citronensäure durch Bakterien.
Justus Liebig's Ann. Chem. 541, 85 - 117

DIMROTH, P.
1976 The prosthetic group of citrate lyase acyl-carrier protein.
Eur. J. Biochem. 64, 269 - 281

DIMROTH, P.
DITTMAR, W.
WALTHER, G.
EGGERER, H.
1973 The acyl-carrier protein of citrate lyase.
Eur. J. Biochem. 37, 305 - 315

DIMROTH, P.
EGGERER, H.
1975 Isolation of subunits of citrate lyase and characterization of their function in the enzyme complex.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3458 - 3462

DIMROTH, P.
EGGERER, H.
1975 Evaluation of the protein components of citrate lyase from Klebsiella aerogenes.
Eur. J. Biochem. 53, 227 - 235

DIMROTH, P.
GREULL, G.
SEYFFERT, R.
LYNEN, F.
1972 6-Methylsalicylic acid synthetase.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 126

DOWNIE, J. A.
GARLAND, P. B.
1973 Respiration-driven proton translocation by yeast mitochondria with differing efficiencies of oxidative phosphorylation.
Biochem. J. 134, 1045 - 1049

ENOCH, H. G.
LESTER, R. L. 1975 The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from E. coli. J. Biol. Chem. 250, 6693 - 6705

ERNSTER, L.
LEE, E. P.
JANDA, S. 1967 The reaction sequence in oxidative phosphorylation. In: Biochemistry of Mitochondria (E. C. Slater, Z. Kaniuga and L. Wojtczak, eds.), 29 - 51; Academic Press Inc., New York

FALOONA, G. R.
SRERE, P. A. 1969 E. coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium and some properties. Biochem. 11, 4497 - 4503

FILLINGAME, R. H. 1975 Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive protein component of the adenosine 5'-triphosphate energy-transducing system of E. coli. J. Bacteriol. 124, 870 - 883

FISCHER, E. H.
HEILMMEYER, L. M. G.
HASCHKE, R. H. 1971 Phosphorylase and the control of glycogen degradation. In: Current Topics in Cellular Regulation Vol. 4 (B. L. Horecker and E. R. Stadtman, eds.), S. 211; Academic Press, New York

GIFFHORN, F. 1974 Regulation der Citrat-Lyase durch chemische Modifikation: Anreicherung und Charakterisierung eines inaktivierenden Enzyms. Diss. Göttingen

GIFFHORN, F.
GOTTSCHALK, G. 1975 Effect of growth conditions on the activation and inactivation of citrate lyase of Rhodopseudomonas gelatinosa. J. Bacteriol. 124, 1046 - 1051

GIFFHORN, F.
GOTTSCHALK, G. 1975 Inactivation of citrate lyase from Rhodopseudomonas gelatinosa by a specific deacetylase and inhibition of this inactivation by L-(+)-glutamate. J. Bacteriol. 124, 1052 - 1061

GINSBURG, A.
STADTMAN, E. R. 1970 Multienzyme systems. Ann. Rev. Biochem. 39, 429 - 472

GOEBELL, H.
KLINGENBERG, M. 1963 Dünnschichtchromatographie von Tricarbonsäurezyklus-Substraten mit Autoradiographie. In: Chromatographie, Symposium II, Société Belge des Sciences Pharmaceutiques Bruxelles 1962

GRAY, C. T.
GEST, H. 1965 Biological formation of molecular hydrogen. A "hydrogen valve" facilitates regulation of anaerobic energy metabolism in many microorganisms. Science 148, 186 - 192

GRAY, C. T.
WIMPENNY, J. W. T.
HUGHES, D.
MOSSMAN, M. R. 1966 Regulation of metabolism in facultative bacteria. I. Structural and functional changes in Escherichia coli associated with shifts between the aerobic and anaerobic states. Biochim. Biophys. Acta 117, 22 - 32

GRAY, C. T.
WIMPENNY, J. W. T.
MOSSMANN, M. R. 1966 Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis and nutrition on the formation of KREBS-cycle enzymes in E. coli. Biochim. Biophys. Acta 117, 33 - 41

GREVILLE, G. D. 1969 Intracellular compartmentation and the citric acid cycle. In: Citric Acid Cycle (J. M. Lowenstein, ed.), S. 1; Marcel Dekker, New York

DeGROOT, G. N.
STOUTHAMER, A. H. 1969 Regulation of reductase formation in Proteus mirabilis. I. Formation of reductases and enzymes of the formic hydrogen lyase complex in the wild type and in chlorate-resistant mutants. Arch. Mikrobiol. 66, 220 - 233

DeGROOT, G. N.
STOUTHAMER, A. H. 1970a Regulation of reductase formation in Proteus mirabilis. II. Influence of growth with azide and of haem deficiency on nitrate reductase formation. Biochim. Biophys. Acta 208, 414 - 427

DeGROOT, G. N.
STOUTHAMER, A. H. 1970b Regulation of reductase formation in Proteus mirabilis. III. Influence of oxygen, nitrate and azide on thiosulfate reductase and tetrathionate reductase formation. Arch. Mikrobiol. 74, 326 - 339

DeGROOT, G. N.
STOUTHAMER, A. H. 1970c Regulation of reductase formation in Proteus mirabilis. IV. Influence of different growth conditions on the formation of various electron transport enzymes in a chlorate-resistant mutant. Arch. Mikrobiol. 74, 340 - 349

GUYNN, R. W.
GELBERG, H. J.
VEECH, R. L. 1973 Equilibrium constants of the malate dehydrogenase, citrate synthase, citrate lyase, and acetyl coenzyme A. Hydrolysis reactions under physiological conditions. J. Biol. Chem. 248, 6957 - 6965

HADDOCK, B. A.
GARLAND, P. B. 1971 Effect of sulphate-limited growth on mitochondrial electron transfer and energy conservation between reduced nicotinamide-adeninedinucleotide and the cytochromes in Torulopsis utilis. Biochem. J. 124, 155 - 170

HADDOCK, B. A.
KENDALL-TOBIAS, M. W. 1975 Functional anaerobic electron transport linked to the reduction of nitrate and fumarate in membranes from E. coli as demonstrated by quenching of atebrin fluorescence. Biochem. J. 152, 655 - 659

HADDOCK, B. A.
SCHAIRER, H. U. 1973 Electron transport chain in E. coli. Reconstitution of respiration in a 5-aminolaevulinic acid-requiring mutant. Eur. J. Biochem. 35, 34 - 45

HADJIPETROU, L. P.
STOUTHAMER, A. H. 1965 Energy production during nitrate respiration by Aerobacter aerogenes. J. Gen. Microbiol. 38, 29 - 34

HAGGERTY, D. M.
SCHLEIF, R. F. 1975 Kinetics of the onset of catabolite repression in E. coli as determined by lac messenger ribonucleic acid initiations and intracellular cyclic acid adenosine 3',5'-monophosphate levels. J. Bacteriol. 123, 946 - 953

HAHN, F. E. 1967 Chloramphenicol. In: Antibiotics I (D. Gottlieb und P. D. Shaw, eds.), 308 - 330; Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, New York

HANCOCK, R. E. W.
BRAUN, V. 1976 Nature of the energy requirement for the irreversible adsorption of Bacteriophages T 1 and Ø 80 to E. coli. J. Bacteriol. 125, 409 - 415

HANSEN, R. G.
HENNING, U. 1966 Regulation of pyruvate dehydrogenase activity in Escherichia coli K 12. Biochim. Biophys. Acta 122, 355 - 358

HANSTEIN, W. G.
HATEFI, Y. 1974 Characterization and localization of mitochondrial uncoupler binding sites with an uncoupler capable of photoaffinity labeling. J. Biol. Chem. 249, 1356 - 1362

HAROLD, F. M. 1970 Antimicrobial agents and membrane function. Adv. Microbiol. Physiol. 4, 45 - 106

HARRISON, D. E. F. 1972 Growth, oxygen and respiration. Crit. Rev. Microbiol. 2, 185 - 228

HARRISON, D. E. F.
MacLENNAN, D. M.
PIRT, S. J. 1969 Responses of bacteria to dissolved oxygen tension. In: Fermentation Advances (D. Perlman, ed.), 117 - 144; Academic Press, New York

HARRISON, D. E. F.
TOPIWALA, H. H. 1974 Transient and oscillatory states of continuous culture.
Adv. Biochem. Engineering 3, 167 - 219

HEINEN, W. 1971 Inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation. In: Methods in Microbiology Vol. 6A (Norris und Ribbons, eds.), 383 - 393; Academic Press, New York

HEMPFLING, W. P.
MAINZER, S. E. 1975 Effect of varying the carbon source limiting growth on yield and maintenance characteristics of Escherichia coli in continuous culture.
J. Bacteriol. 123, 1076 - 1087

HENNING, U. 1963 Ein Regulationsmechanismus beim Abbau der Brenztraubensäure durch Escherichia coli.
Biochem. Z. 337, 490 - 504

HERBERT, D.
ELSWORTH, R.
TELLING, R. C. 1956 Continuous culture of bacteria.
J. Gen. Microbiol. 14, 601 - 622

HERS, H. G.
DeWULF, H.
STALMANS, W.
VANDENBERGHE, G. 1970 The control of glycogen synthesis in the liver.
Adv. Enzyme Regul. 8, 171 - 190

HINO, S.
MAEDO, M. 1966 Effect of oxygen on the development of respiratory activity in E. coli.
J. Gen. Appl. Microbiol. 12, 247 - 265

HIRSCH, C. A. M.
RASMINSKY, M.
DAVIS, B. D.
LIN, E. C. C. 1963 A fumarate reductase in E. coli distinct from succinate dehydrogenase.
J. Biol. Chem. 238, 3770 - 3774

HOLZER, H.
DUNTZE, W. 1971 Metabolic regulation by chemical modification of enzyme.
Ann. Rev. Biochem. 40, 345 - 374

HOPFER, U.
LEHNINGER, A. L.
THOMPSON, T. E.
1968 Protonic conductance across phospholipid bilayer membranes induced by uncoupling agents for oxidative phosphorylation.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59, 484 - 490

JOHNSON, C. L.
CHA, Y.-A.
STERN, J. R.
1975 Citrate uptake in membrane vesicles of Klebsiella aerogenes.
J. Bacteriol. 121, 682 - 687

JONES, K. M.
GUEST, J. R.
WOODS, D. D.
1961 Folic acid and the synthesis of methionine by extracts of E. coli.
Biochem. J. 79, 566 - 574

KABACK, H. R.
1972 Transport across isolated bacterial cytoplasmic membranes.
Biochim. Biophys. Acta 265, 367 - 416

KABACK, H. R.
1974 Transport studies in bacterial membrane vesicles.
Science 186, 882 - 892

KABACK, H. R.
REEVES, J. P.
SHORT, S. A.
LOMBARDI, F. J.
1974 Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. XVIII. The mechanism of action of carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone.
Arch. Biochem. Biophys. 160, 215 - 222

KADNER, R. J.
WINKLER, H. H.
1975 Energy coupling for methionine transport in E. coli.
J. Bacteriol. 123, 985 - 991

KELLY, G. J.
LATZKO, E.
GIBBS, M.
1976 Regulatory aspects of photosynthetic carbon metabolism.
Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 181 - 205

KINGDON, H. S.
SHAPIRO, B. M.
STADTMAN, E. R.
1967 Regulation of glutamine synthetase. VIII. ATP: glutamine synthetase adenylyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 1703 1710

KLEIN, W. L.
BOYER, P. D. 1972 Energization of active transport by E. coli.
J. Biol. Chem. 247, 7257 - 7265

KLEINKAUF, H.
GEVERS, W.
LIPMANN, F. 1969 Interrelation between activation and polymerization in gramicidin S biosynthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 226 - 233

KNAPPE, J.
BLASCHKOWSKI, H. P.
GRÖBNER, P.
SCHMITT, T. 1974 Pyruvate formate-lyase of Escherichia coli: the acetyl-enzyme intermediate.
Eur. J. Biochem. 50, 253 - 263

KNAPPE, J.
SCHACHT, J.
MÖCKEL, W.
HÖPNER, T.
VETTER, H., Jr.
EDENHARDER, R. 1969 Pyruvate formate-lyase reaction in Escherichia coli. The enzymatic system converting an inactive form of the lyase into the catalytically active enzyme.
Eur. J. Biochem. 11, 316 - 327

KOCH, A. L. 1971 The adaptive response of Escherichia coli to a feast and famine existence.
Adv. Microbial Physiol. 6, 147 - 217

KOVAC, L.
KUZELA, S. 1966 Effect of uncoupling agents and azide on the synthesis of ß-galactosidase in aerobically and anaerobically grown E. coli.
Biochim. Biophys. Acta 127, 355 - 365

KREBS, E. G. 1972 Protein kinases. In: Current Topics in Cellular Regulation Vol. 5 (B. L. Horecker u. E. R. Stadtman, eds.), S. 99; Academic Press, New York

KULLA, H. 1973 Die physiologische Bedeutung der chemischen Modifizierbarkeit der Citrat-Lyase von Klebsiella aerogenes.
Diplomarbeit Göttingen

KÜMMEL, A. 1976 Citrat-Lyase aus Streptococcus diacetilactis. Diss. Göttingen

KÜMMEL, A.
BEHRENS, G.
GOTTSCHALK, G. 1975 Citrate lyase from Streptococcus diacetilactis. Association with its acetylating enzyme. Arch. Microbiol. 102, 111 - 116

LAMBDEN, P. R.
GUEST, J. R. 1976 An novel method for isolating chlorate-resistant mutants of E. coli K 12 by anaerobic selection on a lactate plus fumarate medium. J. Gen. Microbiol. 93, 173 - 176

LARA, F. J. S.
STOKES, J. L. 1952 Oxidation of citrate bei E. coli. J. Bacteriol. 63, 415 - 420

LARDY, H. A.
WELLMAN, H. 1952 Oxidative phosphorylations: Role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. J. Biol. Chem. 195, 215 - 224

LARSEN, S. H.
ADLER, J.
GARGUS, J. J.
HOGG, R. W. 1974 Chemomechanical coupling without ATP; the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1239 - 1243

LESTER, R. L.
DeMOSS, J. A. 1971 Effects of molybdate and selenite on formate and nitrate metabolism in Escherichia coli. J. Bacteriol. 105, 1006 - 1014

LIBERMAN, E. A.
TOPALY, V. P.
TSOFINA, L. M.
JASAITIS, A. A.
SKULACHEV, V. P. 1969 Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. Nature 222, 1076 - 1078

LOWENSTEIN, J. M. 1968 Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. In: The Metabolic Roles of Citrate (T. W. Goodwin, ed.), S. 61; Academic Press, New York

LOWRY, O. H.
ROSEBROUGH, N. J.
FARR, A. L.
RANDALL, R. J.
1951 Protein measurement with the folin-phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

LYNEN, F.
1953 Functional group of coenzyme A and its metabolic relations, especially in the fatty acid cycle.
Fed. Proc. 12, 683 - 691

LYNEN, F.
1961 Biosynthesis of saturated fatty acids.
Fed. Proc. 20, 941 - 951

MacGREGOR, C. H.
1975 Anaerobic cytochrome b_1 in E. coli: association with and regulation of nitrate reductase.
J. Bacteriol. 121, 1111 - 1116

MacGREGOR, C. H.
1975 Synthesis of nitrate reductase components in chlorate-resistant mutants of E. coli.
J. Bacteriol. 121, 1117 - 1121

MacGREGOR, C. H.
1976 Biosynthesis of membrane-bound nitrate reductase in E. coli: Evidence for a soluble precursor.
J. Bacteriol. 126, 122 - 131

MACY, J.
KULLA, H.
GOTTSCHALK, G.
1976 H_2-Dependent anaerobic growth of E. coli on L-malate: Succinate formation.
J. Bacteriol. 125, 423 - 428

MACY, J.
PROBST, I.
GOTTSCHALK, G.
1975 Evidence for cytochrome involvement in fumarate reduction and adenosine 5'-triphosphate synthesis by Bacteroides fragilis grown in the presence of hemin.
J. Bacteriol. 123, 436 - 442

MAGASANIK, B.
1961 Catabolite repression.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 249 - 256

MAGASANIK, B. M.
PRIVAL, M. J.
BRENCHLEY, J. E.
TYLER, B. M.
DELEO, A. B.
STREICHER, S. L.
BENDER, R. A.
PARIS, C. G.
1974 Glutamine synthetase as a regulator of enzyme synthesis. In: Current Topics in Cellular Regulation Vol. 8 (B. L. Horecker u. E. R. Stadtman, eds.), 119 - 138; Academic Press Inc., New York

MAHADIK, S. P.
SIVA RAMAN, S.
1968 Citrate lyase: Molecular weight and subunit structure.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 167 - 172

MIKI, K.
LIN, E. C. C.
1975 Anaerobic energy-yielding reaction associated with transhydrogenation from glycerol-3-phosphate to fumarate by an E. coli system.
J. Bacteriol. 124, 1282 - 1287

MIKI, K.
LIN, E. C. C.
1975 Electron transport chain from glycerol-3-phosphate to nitrate in E. coli.
J. Bacteriol. 124, 1288 - 1294

MITCHELL, P.
1961 Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.
Nature 191, 144 - 148

MITCHELL, P.
MOYLE, J.
1967 Acid-base titration across the membrane system of rat-liver mitochondria.
Biochem. J. 104, 588 - 600

MOELLERING, H.
GRUBER, W.
1966 Determination of citrate with citrate lyase.
Analyt. Biochem. 17, 369 - 376

NEIJSSEL, D. M.
TEMPEST, D. W.
1975 The regulation of carbohydrate metabolism in Klebsiella aerogenes NCTC 418 organisms, growing in chemostat culture.
Arch. Microbiol. 106, 251 - 258

NEISH, A. C. 1952 Analytical methods for bacterial fermentations. National Research Council of Canada

NEWTON, N. A. COX, G. B. GIBSON, F. 1971 The function of menaquinone (vitamin K_2) in E. coli K 12. Biochim. Biophys. Acta 244, 155 - 166

O'BRIEN, R. W. STERN, J. R. 1969 Requirement for sodium in the anaerobic growth of Aerobacter aerogenes on citrate. J. Bacteriol. 98, 388 - 393

OHKI, M. 1972 Correlation between metabolism of phosphatidylglycerol and membrane synthesis in E. coli. J. Mol. Biol. 68, 249 - 264

OHKI, R. 1975 Transient repression of catabolite-sensitive enzyme synthesis elicited by 2,4-dinitrophenol. J. Bacteriol. 123, 815 - 823

OHKI, M. MITSUI, H. 1974 Defective membrane synthesis in an E. coli mutant. Nature 252, 64 - 66

OHKI, M. SATO, S. 1975 Regulation of expression of lac operon by a novel function essential for cell growth. Nature 253, 654 - 656

OLTMANN, L. F. 1976 Reductases involved in anaerobic respiration in Proteus mirabilis. Diss. Amsterdam

PAPA, S. 1976 Proton translocation reactions in the respiratory chains. Biochim. Biophys. Acta 456, 39 - 84

PARNES, J. R. BOOS, W. 1973 Energy coupling of the ß-methyl-galactoside transport system of E. coli. J. Biol. Chem. 248, 4429 - 4435

PASTAN, I.
PERLMAN, R. L. 1970 Cyclic adenosine monophosphate in bacteria.
Science 169, 339 - 344

PAVLASOVA, E.
HAROLD, F. M. 1969 Energy coupling in the transport of ß-galactosides by E. coli: Effect of proton conductors.
J. Bacteriol. 98, 198 - 204

PAYNE, W. J. 1973 Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms.
Bacteriol. Rev. 37, 409 - 452

PFENNIG, N.
LIPPERT, D. 1966 Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.
Arch. Mikrobiol. 55, 245 - 256

PICHINOTY, F.
ORANO, L. D. 1961 Influence des conditions de culture sur la formation de la nitrate reductase d'Aerobacter aerogenes.
Biochim. Biophys. Acta 48, 218 - 220

PINSENT, J. 1954 The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. Biochem. J. 57, 10

POOLE, R. K.
HADDOCK, B. A. 1974 Effect of sulphate-limited growth in continuous culture on the efficiency of energy conservation in E. coli.
Biochem. Soc. Trans. 2, 941 - 944

POOLE, R. K.
HADDOCK, B. A. 1975 Effect of sulphate-limited growth in continuous culture on the electron transport chain and energy conservation in E. coli K 12.
Biochem. J. 152, 537 - 546

PRESCOTT, D. J.
VAGELOS, P. R. 1972 Acyl carrier protein.
Adv. Enzymol. 36, 269 - 311

PRUSINER, S.
DAVIS, J. N.
STADTMAN, E. R. 1976 Regulation of glutaminase B in E. coli. I. Purification, properties, and cold lability.
J. Biol. Chem. 251, 3447 - 3456

RABINOWITZ, J. C.
PRICER, W. E., Jr. 1957 An enzymatic method for the determination of formic acid.
J. Biol. Chem. 229, 321 - 328

RAINNIE, D. J.
BRAGG, P. D. 1973 The effect of iron deficiency on respiration and energy-coupling in E. coli.
J. Gen. Microbiol. 77, 339 - 349

Van'T RIET, J.
STOUTHAMER, A. H.
PLANTA, R. J. 1968 Regulation of nitrate assimilation and nitrate respiration in Aerobacter aerogenes.
J. Bacteriol. 96, 1455 - 1464

ROBINSON, J. B., Jr.
SINGH, M.
SRERE, P. A. 1976 Structure of the prosthetic group of K. aerogenes citrate (pro-3S)-lyase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 1872 - 1876

ROSEN, B. P. 1973 ß-Galactoside transport and proton movements in an adenosine triphosphatase-deficient mutant of E. coli.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1289 - 1296

ROSEN, B. P. 1973 Restoration of active transport in an Mg^{2+}-adenosine triphosphatase-deficient mutant of E. coli.
J. Bacteriol. 116, 1124 - 1129

ROSEN, B. P.
ADLER, L. W. 1975 The maintenance of the energized state and its relation to active transport in E. coli.
Biochim. Biophys. Acta 387, 23 - 26

ROSENBERG, H.
COX, G. B.
BUTLIN, J. D.
GUTOWSKI, S. J. 1975 Metabolite transport in mutants of E. coli K 12 defective in electron transport and coupled phosphorylation.
Biochem. J. 146, 417 - 423

ROTHSTEIN, A. 1970 Sulfhydryl groups in membrane structure and function.
Curr. Top. Membranes Transp. 1, 135 - 176

SAIER, M. H., Jr.
FEUCHT, B. U.
McCAMAN, M. T.
1975 Regulation of intracellular adenosine cyclic 3':5'-monophosphate levels in E. coli and S. typhimurium.
J. Biol. Chem. 250, 7593 - 7601

SASARMAN, A.
SURDEANU, M.
HORODNICEANU, T.
1968 Locus determining the synthesis of 5-aminolaevulinic acid in E. coli K 12.
J. Bacteriol. 96, 1882 - 1884

SCHAAB, C.
GIFFHORN, F.
SCHOBERTH, S.
PFENNIG, N.
GOTTSCHALK, G.
1972 Phototrophic growth of Rhodopseudomonas gelatinosa on citrate; accumulation and subsequent utilization of cleavage products.
Z. Naturforsch. 27b, 962 - 967

SCHAIRER, H. U.
1975 Energy linked reactions in mutants of E. coli defective in oxidative phosphorylation.
Proceedings of the Tenth FEBS Meeting, 211 - 223

SCHAIRER, H. U.
FRIEDL, P.
SCHMID, B. I.
VOGEL, G.
1976 The use of several energy-coupling reactions in characterizing mutants of E. coli K 12 defective in oxidative phosphorylation.
Eur. J. Biochem. 66, 257 - 268

SCHMELLENKAMP, H.
EGGERER, H.
1972 Enzymkatalysierte Reaktivierung inaktiver Citrat-Lyase.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1563 - 1564

SCHMELLENKAMP, H.
EGGERER, H.
1974 Mechanism of enzymic acetylation of des-acetyl citrate lyase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1987 - 1991

SCHUTT, H.
HOLZER, H.
1972 Biological function of the ammonia-induced inactivation of glutamine synthetase in E. coli.
Eur. J. Biochem. 26, 68 - 72

SEGAL, H. L.
1973 Enzymatic interconversion of active and inactive forms of enzymes.
Science 180, 25 - 32

SHEMYAKIN, M. M.
VINOGRADOVA, E. J.
FEIGINA, M. Y.
ALDANOVA, N. A.
LOGINOVA, N. F.
RYABOVA, I. D.
PAVLENKO, I. A.
1965 The structure-antimicrobial relation for valinomycin depsipeptides. Experientia 21, 548 - 552

SHOWE, M. K.
DeMOSS, J. A.
1968 Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in E. coli. J. Bacteriol. 95, 1305 - 1313

SIMON, E. J.
SHEMIN, D.
1953 The preparation of succinyl-coenzyme A. J. Amer. Chem. Soc. 75, 2520 - 2521

SIMONI, R. D.
POSTMA, P. W.
1975 The energetics of bacterial active transport. Ann. Rev. Biochem. 44, 523 - 554

SIMONI, R. D.
SHALLENBERGER, M. K.
1972 Coupling of energy to active transport of amino acids in E. coli. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2663 - 2667

SINGH, M.
BÖTTGER, B.
STEWART, L.
BROOKS, G. L.
SRERE, P. A.
1973 S-Acetyl phosphopantetheine: deacetyl citrate lyase S-acetyl transferase from K. aerogenes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1 - 9

SINGH, M.
SRERE, P. A.
1971 The reaction inactivation of citrate lyase from A. aerogenes. J. Biol. Chem. 246, 3847 - 3850

SINGH, M.
SRERE, P. A.
KLAPPER, D. G.
CAPRA, J. D.
1976 Subunit and chemical composition of citrate lyase from Klebsiella pneumoniae. J. Biol. Chem. 251, 2911 - 2915

SPENCER, M. E.
GUEST, J. R.
1973 Isolation and properties of fumarate reductase mutants of E. coli. J. Bacteriol. 114, 563 - 570

SPROTT, G. D.
DIMOCK, K.
MARTIN, W. G.
SCHNEIDER, H.
1975 Differences in coupling of energy to glycine and phenylalanine transport in aerobically grown E. coli. J. Bacteriol. 123, 828 - 836

SRERE, P. A.
1959 The citrate cleavage enzyme. I. Distribution and purification. J. Biol. Chem. 234, 2544 - 2547

SRERE, P. A.
BÖTTGER, B.
BROOKS, G. C.
1972 Citrate lyase: A pantothenate-containing enzyme. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1201 - 1202

SRERE, P. A.
LIPMANN, F.
1953 An enzymatic reaction between citrate, ATP and CoA. J. Amer. Chem. Soc. 75, 4874

STERN, J. R.
1967 Oxalacetate decarboxylase of Aerobacter aerogenes. Inhibition by avidin and requirement for sodium ion. Biochem. 6, 3545 - 3551

STOCKDALE, M.
SELWYN, M. J.
1971 Influence of ring substituents on the action of phenols on some dehydrogenases, phosphokinases and the soluble ATPase from mitochondria. Eur. J. Biochem. 21, 416 - 423

STOUTHAMER, A. H.
BETTENHAUSSEN, C. W.
1975 Determination of the efficiency of oxidative phosphorylation in continuous cultures of Aerobacter aerogenes. Arch. Microbiol. 102, 187 - 192

SZYBALSKI, W.
IYER, V. N.
1967 The mitomycins and porfiromycins. In: Antibiotics I (D. Gottlieb u. P. D. Shaw, eds.), 211 - 245; Springer-Verlag

TATE, S. S.
DATTA, S. P.
1965 The equilibrium of the reaction catalyzed by citrate oxaloacetate lyase. Biochem. J. 94, 470 - 477

TER WELLE, H. F.
SLATER, E. C.
1964 Uncoupling of respiratory-chain phosphorylation by arsenate and evidence for the existence of a stable X~P intermediate of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 89, 385 - 388

TIKKA, J. 1935 Über den Mechanismus der Glucosevergärung durch B. coli. Biochem. Z. 279, 264 - 288

TING, H. P.
WILSON, D. F.
CHANCE, B. 1970 Effects of uncouplers of oxidative phosphorylation on the specific conductance of bimolecular lipid membranes. Arch. Biochem. Biophys. 141, 141 - 146

VAUGHN, R. H.
OSBORNE, J. T.
WEDDING, G. J.
TOBACHNIK, J.
BEISEL, C. G.
BRAXTON, T. 1950 The utilization of citrate by E. coli. J. Bacteriol. 60, 119 - 127

WALTHER, R.
HIPPE, H.
GOTTSCHALK, G. 1976 Citrate, a specific substrate for isolation of Clostridium sphenoides. J. Bacteriol. (zur Veröffentlichung eingereicht)

WAYNE, P. K.
ROSEN, O. M. 1974 Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in E. coli during transient and catabolite repression. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1436 - 1440

WEHRLI, W.
KNÜSEL, F.
STAEHELIN, M. 1968 Action of rifamycin on RNA-polymerase from sensitive and resistant bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 284 - 288

WEHRLI, W.
STAEHELIN, M. 1975 Rifamycins and other ansamycins. In: Antibiotics III (Y. W. Corcoran u. F. E. Hahn, eds.), 252 - 268; Springer-Verlag

WEINBACH, E. C.
GARBUS, J. 1969 Mechanism of action of reagents that uncouple oxidative phosphorylation. Nature 221, 1016 - 1018

WHEAT, R. W.
AJL, S. J. 1955 Citritase, the citrate-splitting enzyme from E. coli E 26. J. Biol. Chem. 217, 897 - 920

WILSON, D. M.
ALDERETE, J. F.
MALONEY, P. C.
WILSON, T. H.
1976 Protonmotive force as the source of energy for adenosine 5'-triphosphate synthesis in E. coli.
J. Bacteriol. 126, 327 - 337

WILSON, D. F.
TING, H. P.
KOPPELMANN, M. S.
1971 Mechanism of action of uncouplers of oxidative phosphorylation.
Biochemistry 10, 2897 - 2902

WINKLER, H. H.
WILSON, T. H.
1966 The role of energy coupling in the transport of ß-galactosides by E. coli.
J. Biol. Chem. 241, 2200 - 2211

WOOD, H. G.
AHMAD, F.
JAKOBSON, B.
CHUANG, M.
BRATTIN, W.
1975 Isolation of the subunits of transcarboxylase and reconstitution of the active enzyme from the subunits.
J. Biol. Chem. 250, 918 - 926

WULFF, K.
MECKE, D.
HOLZER, H.
1967 Mechanism of the enzymatic inactivation of glutamine synthetase from E. coli.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 740 - 745

YAMANOTO, T. H.
MEVEL-NINIO, M.
VALENTINE, R. C.
1973 Essential role of membrane ATPase or coupling factor for anaerobic growth and anaerobic active transport in E. coli
Biochim. Biophys. Acta 314, 267 - 275

An dieser Stelle möchte ich meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. Gerhard Gottschalk meinen Dank aussprechen. Er hat mir das Thema gestellt und war am Fortgang der Arbeit stets interessiert. In schwierigen Situationen war sein Rat, wie ich heute weiß, eine unentbehrliche Hilfe.

Allen anderen, die mir geholfen haben, besonders aber meinen Freunden in den Labors 247 und 255, danke ich für die Unterstützung und Zusammenarbeit.

Den Doktores Andreesen, Gibson, Guest, Harold, Kaback, Rosen, Schairer, Singh und Young bin ich für Materialhilfe sehr dankbar.

Lebenslauf

26. 5. 1949	geboren in Egling/Bayern
1955 - 1959	Grundschule in Limburg/Lahn
1959 - 1968	Leibnizgymnsium in Frankfurt-Höchst; mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
1968	Schulabschluß mit dem Abitur
1968 - 1970	Studium der Biologie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt; Vordiplom
1970 - 1972	Studium der Mikrobiologie in Göttingen
1972	mündliche Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und organische Chemie
1973	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie mit dem Thema: "Die physiologische Bedeutung der chemischen Modifizierbarkeit der Citrat-Lyase von Klebsiella aerogenes"
Anfang 1974	Beginn mit den Arbeiten zur vorliegenden Dissertation